

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 15/19, C12P 21/02 C12N 5/10	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/10312
		(43) 国際公開日 1994年5月11日 (11.05.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01540 (22) 国際出願日 1993年10月25日 (25. 10. 93) (30) 優先権データ 特願平 4/286153 1992年10月23日 (23. 10. 92) JP 特願平 4/301387 1992年11月11日 (11. 11. 92) JP 特願平 4/329546 1992年12月9日 (09. 12. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) (JP/JP) 〒115 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山口 希 (YAMAGUCHI, Nozomi) (JP/JP) 〒603 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル御盛口町285-79 Kyoto, (JP) 小嶋哲郎 (KOJIMA, Tetsuo) (JP/JP) 大枝匡義 (OH-EDA, Masayoshi) (JP/JP) 服部有宏 (HATTORI, Kunihiro) (JP/JP) 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 湯浅恭三, 外 (YUASA, Kyoze et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : GENE CODING FOR MEGAKARYOCYTE POTENTIATOR		
(54) 発明の名称 巨核球増殖因子をコードする遺伝子 (57) Abstract A gene coding for a polypeptide having a human megakaryocyte potentiator activity; a recombinant vector containing the gene; a host transformed by the vector; and a process for producing a polypeptide having a human megakaryocyte potentiator activity by culturing the host and isolating the polypeptide from the culture medium.		

(57) 要約

ヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、この遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換された宿主、及び該宿主を培養し、その培養物から前記ポリペプチドを採取することを特徴とするヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドの製造方法。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュー・ジーランド		

明 細 書

巨核球増幅因子をコードする遺伝子

技術分野

本発明は遺伝子に関し、さらに詳しくは、多能性血液幹細胞より分化した巨核球コロニー形成細胞 (Megakaryocyte Colony-Forming Unit.) に作用しインターロイキン-3 (IL-3) 等の巨核球コロニー刺激因子 (Megakaryocyte Colony-Stimulating Factor : Meg-CSFと略記する) 活性を有する物質の存在下に巨核球の成熟を促進するヒト由来の巨核球増幅因子 (Megakaryocyte Potentiator (以下Meg-POTと略記することあり)) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換ベクター、該ベクターによる形質転換体、及び該遺伝子を用いた巨核球増幅因子の製造方法に関する。

本発明の遺伝子は、in vitroにおいてIL-3存在下、用量依存的に巨核球コロニーを増幅させる作用を有する巨核球増幅因子をコードする。本発明の遺伝子を、適当なベクターに挿入した後、常用の宿主細胞を形質転換することにより大量に均一な巨核球増幅因子を製造することが可能となる。このことから、本発明は、例えば血小板減少あるいは血小板の機能低下を伴う疾患に対して臨床上の有用性が期待される治療剤の提供が可能となる。

背景技術

血小板は、生体の止血、血栓形成に重要な意義を持つ血液有形成分の一つである。血小板は、骨髓中の造血幹細胞から巨核球系前駆細胞を経て巨核芽球となり、さらに成熟した巨核球から血液中に放出される。

骨髓細胞から巨核球コロニーを形成させるには、2種類の異なった作用を持つ因子が必要であると考えられている(Williams, N et al. 「J. Cell Physiol.」 110, 101 (1982))。すなわち、それを加えるだけで巨核球コロニーが形成されるMeg-CSFと、それだけでは巨核球コロニーを形成させる活性はないが、Meg-CSFとともに加えると巨核球コロニー数を増やしたり、その成熟を促進する作用を示すMeg-POTである。

ヒトではMeg-CSF活性を有するものとしてIL-3(Teramura, M et al.

「Exp.Hematol.」16, 843 (1988)) や顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (Teramura,M et al. 「Exp.Hematol.」17, 1011 (1989))等が知られている。また、ヒトでMeg-POT活性を有するものとしては、インターロイキン6 (Teramura,M and Mizoguchi,H 「Int.J.Cell Cloning」8, 245 (1990))、インターロイキン11 (Teramura,M et al. 「Blood」79, 327 (1992))、エリスロポエチン (Bruno,E et al. 「Blood」73, 671 (1989)) 等が知られている。

しかし、これらのものは巨核球・血小板系に特異的な因子ではなく、むしろ他の血球系や血球系以外の細胞にも作用を有していることが知られている。従って、これらのものを医薬品として巨核球・血小板系への作用を期待して投与した場合、それとは別の作用をも発現してしまうことが危惧される。このようなことから、巨核球・血小板系に特異的に作用し、医薬品としての有用性の高い生理活性物質が望まれている。

そこで巨核球・血小板系に作用する新規な巨核球増幅因子を見出すと同時に、該巨核球増幅因子を医薬用途に用いるために、それを大量に得る必要があった。

巨核球増幅因子を産生細胞の培養上清から単離する方法では、培養上清中の巨核球増幅因子濃度が低く、均一な巨核球増幅因子を得るには複雑な精製工程を必要とし、かつ微量にしか得られない等の難点があった。従って上記利用目的のため、組換えDNA技術を用いて、巨核球・血小板系に作用する新規な巨核球増幅因子を大量に製造することが望まれていた。

かかる状況において、本発明者らは、ヒト脾臓癌細胞由来の株化細胞「HPC-Y5」の培養上清中に巨核球増幅活性を見出し、該培養上清中から巨核球増幅活性を指標として目的とする新規な巨核球増幅因子を精製し、その性状を明らかにした (国際出願番号:PCT/J P 92/01689、国際公開番号:WO 93/13132)。

さらに、そのアミノ酸配列の情報をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、「HPC-Y5」より調製したmRNAから作製したcDNAライブラリーから、上記合成プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (以下PCRと略記する) により、巨核球増幅因子をコードするDNA断片を得た。次いで、このDNA断片をプローブとして、cDNAライブラリーをスクリーニングにかけ、目的とする新規な巨核球増幅因子をコードする遺伝子を単離することに成功し、

その全塩基配列を明らかにした。

- また、この遺伝子を適当なベクターに挿入した後、この発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、次に、産生された目的蛋白質を分離・精製することにより新規な巨核球増幅因子を大量に製造することができることも明らかにした。
- 5

発明の開示

従って、本発明は、ヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を提供する。

- 本発明はさらに、ヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターを提供する。
- 10

本発明はまた、ヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された原核もしくは真核宿主細胞を提供する。

- 本発明はさらに、ヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換して得られた形質転換株を培養し、産生された目的蛋白質、好ましくはヒト巨核球増幅因子活性を有する蛋白質の製造方法を提供する。
- 15

図面の簡単な説明

- 図1は実施例3におけるステップ-7の逆相HPLC(III)の結果を示す。
- 20 図2はプラスミドpKPO27の構造を示す。
- 図3はプラスミドpRVHKPO27の構造を示す。
- 図4はプラスミドpRVHKPO27fの構造を示す。
- 図5はプラスミドpCITE・KPO27の構造を示す。
- 図6はプラスミドpMBPKPO27の構造を示す。

図7はプラスミドpEFDKPOfの構造を示す。

図8は、CHO細胞を用いて発現した培養上清をSDS/PAGEにて分析して、N末近傍の合成ペプチドを抗原として作成した抗体を用いたウエスタンブロットの図を示す。レーン1：分子量マーカー、レーン2：サンプル。

5 図9は、CHO細胞を用いて発現した培養上清の各精製画分（実施例29（i）参照）をSDS/PAGEにて分析して、実施例24で作製するMeg-POTに対する抗体を用いて行ったウエスタンブロットの図を示す。レーン1：分子量マーカー、レーン2：素通りおよび洗浄画分、レーン3：0.1M NaCl画分、レーン4：0.2M NaCl画分、レーン5：0.3M NaCl画分、
10 レーン6：0.5M NaCl画分、レーン7：1.0M NaCl画分。

図10は、CHO細胞を用いて発現した培養上清の各精製画分（実施例29（iii）参照）をSDS/PAGEにかけた後行ったウエスタンブロットの図を示す。レーン1：溶出時間42～43分の画分、レーン2：溶出時間43～44分の画分、レーン3：溶出時間44～45分の画分、レーン4：溶出時間45～46
15 分の画分。

図11は、修飾体Meg-POT発現ベクター構築のために実施したPCRのプライマーの位置を示す。

図12は、修飾体Meg-POT発現ベクターpEFNKPOS、pEFNKPOL252V、pEFNKPOQ220Eの構造を示す。

20 発明の詳細な説明

巨核球増幅因子の遺伝子は、例えば巨核球増幅因子を産生する細胞等からmRNAを調製した後、既知の方法により二本鎖cDNAに変換することにより得られる。このmRNAの供給源となる細胞は、本発明においてはヒト脾臓癌腫瘍細胞由来の株化細胞「HPC-Y5」（Nozomi Yamaguchi et al. CANCER RESEARCH
25 H 50 7008 1990）、（1991年12月27日 工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第3703号（FERM BP-3703）としてブタベスト条約に基づき国際寄託）を用いたが、腫瘍細胞株に限らず、哺乳動物から分離できる細胞、あるいは樹立した他の細胞株でもよい。

また、mRNAの調製は本発明においてはグアニジンチオシアネート処理後、

塩化セシウム密度勾配遠心を行い(Chirgwin et al. Biochemistry 18 5294 1979)
) 全RNAを得たが、すでに他の生理活性蛋白の遺伝子をクローン化する際に用
いられた方法、例えばバナジウム複合体等のリボヌクレアーゼインヒビター存在
下に界面活性剤処理、フェノール処理を行う(Berger & Birkenmeier, Biochemi
stry, 18 5143 1979) 方法を用いることができる。

全RNAからのpoly(A)⁺RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体、
例えばセファロースやセルロース等を用いたアフィニティーカラムクロマトグラ
フィーかバッチ法により行うことができる。また、ショ糖密度勾配遠心法等によ
りpoly(A)⁺RNAをさらに精製することもできる。その他、いったんRNA
を調製せずに直接poly(A)⁺RNAを得る方法もある。

上記の如くして得たmRNAから二本鎖cDNAを得るには、例えばmRNA
を鋳型にして、3'端にあるpolyA-鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダ
ムプライマー或いは巨核球増幅因子のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴ
ヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理してmRNAに相補的なDN
A(cDNA)を合成する。

mRNAをアルカリ処理により分解・除去した後、得られた一本鎖cDNAを
鋳型にして逆転写酵素あるいはDNAポリメラーゼ(例えばKlenow断片等)処理
後、S1ヌクレアーゼなどで処理するか、直接RNase HおよびDNAポリ
メラーゼ等で処理することによっても二本鎖cDNAを得ることができる(Mania
tis et al. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory 1982およびGu
bler & Hoffman, Gene 25 263 1983)。

巨核球増幅因子をコードするcDNAを単離するには、例えば巨核球増幅活性
を指標とするか抗体を用いて直接発現クローニング等の方法で行うことができる
。巨核球増幅活性の測定は、IL-3存在下で骨髓細胞を用いた軟寒天培養法
を適用して実施できる。

即ち、ウマ血清(56°C 30分処理、Biocell社製)0.2ml、マウス(C
57BL/6N系雄性、6~12週齢)大腿骨骨髓細胞浮遊液0.1ml(2×10^5 有核細胞)、
組換え型マウスIL-3を5ng/ml含むIscoe's Modified Du
lbecco's培養液(IMDM)0.2ml、寒天を0.75%含む改変McCoy's 5A
培養液0.4ml、および被検検体(10%ウマ血清を含むIMDMで希釈したも

の) 0.1 mlを混合して、直径35 mmの組織培養プラスチックディッシュに入れて固まらせたのち、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件で培養を行う。

5 培養6日目に寒天層ごとスライドガラス上に取出し乾燥させ、フィルム状標本としたものを5%グルタルアルデヒドで固定し、Nakeffらの方法(Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 151 587 1976)に従って、アセチルコリンエステラーゼ染色し、巨核球コロニー数の算定を行う。この際、アセチルコリンエステラーゼ染色陽性細胞を4個以上含む集塊を巨核球コロニーとする。検鏡の倍率は40倍である。なお、Meg + POT活性は、被検検体を添加して生じた巨核球コロニー数と被検検体
10 体を添加せずに(10%ウマ血清を含むIMDMのみ添加)組換え型IL-3単独で生じた巨核球コロニー数との差を指標とする。

本発明者らは、巨核球増幅因子を産生する株化細胞の培養上清から巨核球増幅因子を単離精製し、そのアミノ酸配列の情報をもとにプライマーを合成し、PCRを用いて、ヒト由来巨核球増幅活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子断片をクローニングした。そのDNAをプローブとして既知の方法によりcDNAライブラリーから目的とする新規な巨核球増幅因子をコードする完全長cDNAを含むクローンをスクリーニングした。
15

なお、これらのcDNAをpBlue script SK(-)のEcoRI, XhoI 切断部位間に挿入したpKPO27を含有する大腸菌(E. coli) JM109株、およびpKPO
20 21を含有する大腸菌(E. coli) JM109株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、各々、平成4年10月12日に微工研条寄第4029号(FERM BP-4029)、平成4年11月10日に微工研条寄第4071号(FERM BP-4071)としてブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

また、本発明で用いたPCRを繰り返し行うことで、完全長のcDNAを得ることもできる。また、PCRによらずアミノ酸配列の情報からプローブを合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。
25

このようにして、クローン化された巨核球増幅因子をコードする遺伝子は適当なベクターDNAに組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主細胞を形質転換させることができる。
30

さらに、これらのベクターに適切なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合蛋白質として発現させ、精製を容易にしたり、発現量を上げ、精製工
5 程中で適当な処理をほどこすことにより、目的とする蛋白質を切り出すことも可能である。また、連結する遺伝子を他の生理活性因子のものをを用い融合蛋白質のまま、巨核球増幅活性を増強するような試みも可能である。

一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子等で知られているように、多形現象を示すと考えられ（例えば、Nishi等、J.Biochem. 97 153 198
10 5）、この多形現象によって1個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

また、配列番号12もしくは13のアミノ酸配列の中の1個またはそれ以上のアミノ酸を欠くかまたは付加したポリペプチドあるいはアミノ酸が1個もしくはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでも巨核球増幅活性を有することが
15 がある。例えば、ヒトインターロイキン2（IL-2）遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する配列に変換して得られたポリペプチドがIL-2活性を保持することも既に公知となっている（Wang等、Science, 224 1431 1984）。

また、真核細胞で発現させた場合その多くは糖鎖が付加されるが、アミノ酸を
20 1ないしそれ以上変換することにより糖鎖付加を調節することができるがこの場合も、巨核球増幅活性を有することがある。それゆえ、本発明における巨核球増幅因子の遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたポリペプチドをコードする遺伝子は全て本発明に含まれる。その際、無作為にアミノ酸を変換したポリペプチドをコードする遺伝子を作製することもできるが、例えば、ヒト以外の動物種（マウス、ラット、サル等）の巨核球増幅因子活性を有するタンパク質のア
25 ミノ酸配列を参考にして塩基配列を置換、欠除して種々の修飾体をコードする遺伝子を作製することも可能である。

さらに、得られたポリペプチドが巨核球増殖活性を有し、配列番号12もしくは13に示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする遺伝子とハイブリ
30 リダイズする遺伝子も本発明に含まれる。なお、ハイブリダイゼーション条件は

、通常行われているプローブハイブリダイゼーションの条件を適用することでもできる（例えばMolecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）。

5 本発明の発現ベクターは、複製起源、選択マーカー、発現させようとする遺伝子の前に位置するプロモーター、RNAスプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを含んでいる。

哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしてはレトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）などのウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1 α （HEF-1 α ）などの細胞由来のプロモーターを用いればよい。
10 例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulliganなどの方法(Nature 277 108 (1979))に従えば容易に実施することができる。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることができ、選択マーカーとしては、ホスホトランスフェラーゼAPH（3'）IIあるいはI(neo)遺伝子、
15 チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子等を用いることができる。

また、原核宿主細胞、例えば大腸菌の場合には、それを宿主とするベクターであるpBR322を用いて形質転換することができる(Boliver等 : Gene 2 95 (1975))。pBR322はアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性の遺伝子を含んでおり、どちらかの耐性を利用することによって形質転換細胞を同定することができる。原核生物宿主の遺伝子発現に必要なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼ遺伝子のプロモーター(Chang等 : Nature 275 615 (1978))、やラク
20 ースプロモーター(Goeddel等 : Nature 281 544 (1979)) およびトリプトファンプロモーター(Goeddel等 : Nucleic Acid Res. 8 4057 (1980))、tacプロモーター等があげられ、どのプロモーターも本発明のヒト巨核球増幅因子の発現に使用できる。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸
30 菌 (Escherichia coli)、バシルス・ズブチリス (Bacillus subtilis)、バ

シルス・サーモフィルス (Bacillus thermophilus) 等が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシエー (Saccharomyces cerevisiae) 等が挙げられ、哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えばCOS細胞、チャイニーズ ハムスター卵巣 (CHO) 細胞、C 1 2 7 細胞、3 T 3 細胞、He l a 細胞、BHK細胞、ナバルバ細胞などが挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行えばよい。

以上のようにして目的とする巨核球増幅因子をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生した巨核球増幅因子は、細胞内または細胞外から分離し均一にまで精製することができる。

なお、本発明の目的蛋白質であるヒト巨核球増幅因子の分離・精製は、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せれば、ヒト巨核球増幅因子は分離・精製することができる。

10 実施例

本発明の巨核球増幅因子をコードする遺伝子を得る方法、該遺伝子を有する組換えベクター及びこれを含有する形質転換体並びにこの形質転換体を培養し取得した目的の蛋白質、並びに夫々の製造方法について、以下の実施例によって詳細に説明するが、この実施例によって本発明が限定されるものではない。

15 実施例 1. Meg - P O T 産生細胞株 H P C - Y 5 の樹立

脾臓癌患者のリンパ節より得られた腫瘍を 10 % ウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI 1640 培地を用い、炭酸ガスインキュベーター (炭酸ガス濃度 5 %、湿度 100 %) 中にて培養することにより樹立した。この細胞株を 1 % FBS 含有 Ham's F10 培地に順化させ、さらに FBS 濃度を徐々に低下させ、最終的に蛋白不含の Ham's F10 培地中にて増殖し得るまで順化させた。本細胞株はプラスチックディッシュ上で単層状に増殖し、倍化時間は約 33 時間であった (Nozomi Yamaguchi et al. CANCER RESEARCH 50 7008 1990)。この細胞株を HPC - Y5 細胞と称する。

実施例 2. H P C - Y 5 の継代培養およびローラーボトルによる大量培養

実施例1で述べたHPC-Y5細胞の継代培養は以下に示す如く行った。プラスチック培養フラスコ(150cm², Corning社製)を用い、10⁻⁸M亜セレンナトリウム、1,000U/mlペニシリンGカリウムおよび100μg/ml) 硫酸カナマイシンを含むHam's Nutrient Mixture F12培地50ml中でHPC-Y5細胞を培養し、4日毎に培養液を交換した。

細胞継代時に培養液を除去し、あらかじめ37°Cに加温した0.125%トリプシン(GIBCO社製)、0.01%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)(和光純薬社製)を含むカルシウム、マグネシウム不含Dulbecco's Phosphate-buffered saline(PBS)溶液を加え37°Cで5分間加温した。ピペティング操作により細胞を剥離し、15ml容量のプラスチック製遠心管に細胞を移し、1500回転/分、5分間の遠心により細胞を回収した。細胞を上記培地に懸濁し、新しいフラスコ4~5本に継代した。一晚静置後、培養液を非付着性細胞と共に除去し、新たに上記培地を加えて培養を継続した。以後4日毎に培養液を交換した。また、実施例3で述べるMeg-POTの精製に供するためのHPC-Y5細胞のローラーボトルによる大量培養を以下の如く実施した。

上記の如く継代されたHPC-Y5細胞が完全に密に増殖した150cm²のプラスチック培養フラスコより上記の如くトリプシン-EDTAを用いて細胞を回収し、これを0.2%ウシ胎児血清(Hyclone社製)を含有する上記培地250mlに浮遊させ、1700cm²のプラスチック製ローラーボトル(Corning社製)に移し、0.5回転/分の速度で回転培養を行った。7日後に培養液を血清を含まない上記培地に交換し、以後4日毎に上記無血清培地の交換を行うことにより、精製用無血清培養上清を回収した。

実施例3. HPC-Y5株培養上清からのMeg-POTの精製

実施例2で述べた方法に従って得たHPC-Y5細胞の培養上清(27.3リットル)にTween 20を終濃度0.01%となるように加えた後、人工腎臓PAN1200(旭メディカ)を用いて、約200倍に濃縮した。濃縮液を0.01%Tween 20を含む10mM酢酸緩衝液(pH5.0)に対し、4°Cで一晩透析した。透析内液に遠心操作(10000×g, 60分)を施し不溶物を除去し上清を以下の精製に用いた。

30 (ステップ-1) S-Sepharose イオン交換クロマトグラフィー

上述の遠心上清を0.01%Tween 20を含む20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で平衡化したS-Sepharose Fast Flow (Pharmacia社製) カラム(5×10cm)に添加した。同緩衝液でカラムを洗浄した後、同緩衝液中、NaClの濃度を0.15M, 0.5M及び1.0Mと順次上げて吸着蛋白質を溶出した。素通り画分、洗浄画分および各塩濃度における溶出画分について前述の方法に従って活性を測定した結果、0.15M-NaCl溶出画分にMeg-POT活性が認められた。(ステップ-2) DEAE-Sepharose イオン交換クロマトグラフィ

二

ステップ-1で得た活性画分を0.01%Tween 20を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)に対し4℃で一晩透析した。透析内液を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia社製) カラム(2.2×13cm)に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄した。同緩衝液中NaClの濃度を0.15M, 0.5Mおよび1.0Mと順次上げて吸着蛋白質を溶出した。素通り画分、洗浄画分および各塩濃度における溶出画分について前述の方法に従って活性を測定した結果、0.15M-NaCl溶出画分にMeg-POT活性が認められた。(ステップ-3) 逆相HPLC (I)

ステップ-2で得た活性画分に5%トリフルオロ酢酸(TFA)を加えてpHを約2に調整し、0.1%TFAを含む5%アセトニトリルで平衡化した逆相HPLCカラム(Protein C4, 10×250mm, Vydac社製)に流速1.0ml/分で添加した。吸着蛋白質はアセトニトリルの直線濃度勾配(5%→65%、120分、0.5%アセトニトリル/分)により流速1.0ml/分で溶出した。溶出蛋白質の検出は220nmおよび280nmにおける吸光度を追跡することにより行い、1mlずつ分画した。各画分について活性測定を行った結果、アセトニトリル濃度40-45%の画分にMeg-POT活性が認められた。

(ステップ-4) 逆相HPLC (II)

ステップ-3で得た活性画分を0.1%TFAで2倍希釈し、0.1%TFAを含む35%アセトニトリルで平衡化した逆相HPLCカラム(Protein C4, 4.6×250mm, Vydac社製)に流速1.0ml/分で添加した。吸着蛋白質はアセトニトリルの直線濃度勾配(35%→50%、75分、0.2%アセトニトリル/分)により流速1.0ml/分で溶出した。溶出蛋白質の検出は220nmお

よび280nmの吸光度を追跡することにより行い、1mlずつ分画した。各画分について活性測定を行った結果、アセトニトリル濃度40-45%の画分にMeg-POT活性が認められた。

(ステップ-5) DEAE・イオン交換HPLC

- 5 ステップ-4で得た活性画分を凍結乾燥した後、0.01%Tween 20を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、同緩衝液で平衡化したProtein Pak G-DEAEカラム(Waters社製、8.2×75mm)に流速0.7ml/分で添加した。吸着蛋白質はNaClの直線濃度勾配(0.0M→0.2M、40分、5mM NaCl/分)により流速0.7ml/分で溶出した。溶出蛋白質は210
10 20nmで検出し、0.7mlずつ分画した。各画分について活性を測定した結果、NaCl濃度75mM以下の画分にMeg-POT活性が認められた。

(ステップ-6) TSK gel G3000SWゲル濾過

- ステップ-5で得た活性画分を、0.01%Tween 20及び0.15M NaClを含む50mlトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したTSK gel
15 G3000SWカラム(東ソー社製 21.5×600nm、ガードカラム21.5×75nm)に流速3ml/分でカラムに流し、溶出蛋白質は220nmで検出した。3mlずつ分画した各画分について、活性測定した結果、Meg-POT活性は溶出時間49~54分の画分に認められたので、その画分を回収した。

(ステップ-7) 逆相HPLC (III)

- 20 ステップ-6で得た活性画分を5%TFAを加えてpHを約2に調整し、ステップ-4の逆相HPLC (II)と同一条件下にクロマトグラフィーを行った。各画分について活性を測定した結果、主ピーク(アセトニトリル濃度40%-45%)にMeg-POT活性が認められた。この結果を図1に示す。図1において横棒で示す画分を精製Meg-POTとして回収した。

25 実施例4. 巨核球増幅因子(Meg-POT)のアミノ酸配列

(i) N末端アミノ酸配列の決定

- 実施例3で得た精製Meg-POT試料を気相式プロテインシーケンサー470A型(Applied Biosystems社製)を用いてエドマン分解を行い、得られたフェニルチオヒダントイン(PTH)-アミノ酸をPTHアナライザー120型(Applied Biosystems社製)を用いて同定した。その結果、N末端近傍のアミノ酸
30

配列（配列-1～3）は以下に示す3種が認められた。

[表1]

配列-1

(配列番号: 1)

Leu Ala Gly Glu Xaa Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu
1 5 10 15

(なお、Xaaは未同定のアミノ酸を示す。以下同じ。)

配列-2

(配列番号: 2)

Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu Ala
1 5 10 15

配列-3

(配列番号: 3)

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu Ala Asn
1 5 10 15

(配列の下に示す数字はエドマン分解時のサイクル数である)

上記配列-1～配列-3のアミノ酸配列において以下のアミノ酸配列が共通していることが認められた。

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu (配列番号: 4)

5 (ii) エンドプロテイナーゼGlu-C消化

試料を0.1M炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH7.8)に溶解し、尿素およびジチオスライトール(DTT)をそれぞれ終濃度が、7.8Mおよび50mMとなるように加え、37℃で2時間インキュベートした。そこに、Endo Glu-C(Boehringer-Mannheim社製)を0.5μg加え、37℃で2時間反応させた後

、さらに同量の酵素を加え、再度37℃で18時間反応させた。反応液に10%トリフルオロ酢酸(TFA)を加えてpHを2とした後、0.1%TFAで平衡化したC18カラム(4.6×25cm, Vydac社製)にかけた。

5 ペプチドの溶出は0.1%TFA中、アセトニトリルの濃度を128分間に0から64%まで、その後16分間に80%まで直線的に上げて行った。ペプチドは220nmおよび280nmの二波長で検出した。得られた部分消化ペプチド断片について順次、気相式プロテインシーケンサー473A型(Applied Biosystems社製)を用いてアミノ酸配列を分析した。

10 その結果、部分消化断片のうちのひとつは以下に示す配列を有することがわかった。

Leu-Ala-Val-Ala-Leu-Ala-Gln-Lys-Asn-Val-Lys-Leu-Ser-Thr-Glu-Gln-Leu-Arg-Xaa-Leu-Ala-His-Arg-Leu-Ser-Glu-Pro-Pro-Glu-Asp-Leu-Asp-Ala-Leu-Pro- - -
(配列番号5)

実施例5. HPC-Y5細胞からのpoly(A)⁺RNAの調製

15 HPC-Y5細胞からChirgwin等(Biochemistry, 18 5294 (1979))により記載されている方法に従って全RNAを調製した。すなわち、約1×10⁹個のHPC-Y5細胞を49mlの31.25mMクエン酸ナトリウム及び0.625%ラウリルサルコシネートを含む5Mグアニジンチオシアネート(Fulka社製)溶液中で完全にホモジナイズした。ホモジネートを遠心管中の0.1M EDTAを含む5.3M塩化セシウム溶液層上に重層し、次にこれをSW40ローター(Beckman社製)で31,000rpmにて20℃で17時間遠心分離することによりRNAを沈殿させた。

20 RNA沈殿物を80%エタノールにて洗浄し、1mM EDTA及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含有する10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)2-4ml中に溶解し、プロナーゼ(Boehringer Mannheim社製)を0.5mg/mlとなるように添加した後、37℃にて20分間保温した。RNA溶液をフェノール処理することにより蛋白質を除いた。溶液中の残存フェノールをクロロホルムで抽出した後、RNAをエタノールで沈殿させた。

全RNAからpoly(A)⁺RNAをoligo(dT) cellulose spun columnからなるmRNA Separator(Clontech laboratories社製)を用いて精製した。キット

添付の処方に従って、二度精製を繰り返すことにより精製度を高めた。

上記操作を2回行い、それぞれ37 μ g及び190 μ gのpoly(A)⁺RNAを得た。

実施例6. PCR用cDNAライブラリーの構築

- 5 上記poly(A)⁺RNA 10 μ gを材料としてcDNA合成キットc-CLON E (Clontech laboratories社製)を用いて二本鎖cDNAを合成し末端にはEcoRIリンカーを付着した。遊離のEcoRIリンカーはアガロースゲル電気泳動にて分離した後、600塩基対以上の長さを持つcDNAはGeneluter(Invitrogen社製)を用いた電気溶出により回収した。このリンカー付加二本鎖cDNA
10 と予めEcoRI及びアルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)処理した λ ZAP IIベクター(Stratagene社製)とを、7mM塩化マグネシウム、1mM DTT, 1mM ATP及び2単位のT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中で4 $^{\circ}$ Cにて24時間保温して連結した。

- 15 これをGigapack Gold II packaging extract (Stratagene社製)を用いてパッケージングし、HPC-Y5細胞のcDNAライブラリーを構築した。さらにこのライブラリーを7つのプール(A-G)に分け、増幅し、5.8g/l塩化ナトリウム、2g/l硫酸マグネシウム・7水和物および0.01%ゼラチンを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中に回収した。

実施例7. PCRによるクローニング

- 20 λ ZAP IIのEcoRIサイト近傍のT7プロモーター配列のプライマーT7, T3プロモーター近傍配列のプライマーT3-2及び本因子のN末端近傍の部分アミノ酸配列 Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Alaをコードする遺伝子として可能性のある全てのコドンを含むミックスプライマーN1を381A DNA Synthesizer(Applied Biosystems社製)用いて合成した。

- 25 さらに実施例4(ii)に示したように、本因子のEndo Glu-C断片(配列番号5)中に Ala-Gln-Lys-Asn-Val-Lys-Leu-Ser-Thr-Glu-Gln-Leu-Arg-Xaa-Leu-Ala-His-Arg-Leu-Ser- Glu-Pro-Pro-Glu-Asp-Leu-Asp-Ala という比較的コドンusageの低い配列(下線部)が見いだされたため、このアミノ酸配列をもとにこれらをコードする遺伝子として可能性のある全ての塩基配列を含むミックスプライマーK4S及びK4-2Aも同様に合成した。これらプライマーの塩基配列を
30 以下に示す。

T 7 : 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'

T 3 - 2 : 5' - CATGATTACGCCAAGCTCGAA - 3'

N 1 : 5' - GG(GATC)GA(GA)AC(GATC)GG(GATC)CA(GA)GA(GA)GC - 3'

(センス)

K 4 S : 5' - GC(GATC)CA(AG)AA(AG)AA(TC)GT(GATC)AA(AG)(TC)T - 3'

(センス)

K 4 - 2 A : 5' - GC(GA)TC ((GATC)AG or (TC)AA) (AG)TC(TC)TC(GATC)GG

(GATC)GG(TC)TC - 3 酢酸マグネシウム、0.1 mM EDTA を含

5 む 500 mM 酢酸ナトリウム中で破碎し、37°C で16時間保温してDNAを抽出した。エタノールで沈殿させたDNAを1 mM スベルミジン、0.1 mM EDTA を含む20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) 75 μ l に溶解し90°C で2分間加熱後、急冷し100 mM 2-メルカプトエタノール、100 mM 塩化マグネシウムを含む500 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) を10 μ l、10 mM ATP を13 μ l、ポリヌクレオチド キナーゼ (東洋紡社製) を20単位添加後37°C 1時間反応させて5' 端をリン酸化した。

10 DNA 溶液をフェノール処理することにより蛋白質を除いた。溶液中の残存フェノールをクロロホルムで抽出した後、DNA をエタノールで沈殿させた。制限酵素 Sma I (宝酒造社製) 及びアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) で処理したベクター pSP73 (Promega 社製) とこのDNA 試料を7 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT, 1 mM ATP 及び2単位のT4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) を含む50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 20 μ l 中で16°C にて16
15 時間保温して連結した。

次に上記連結混合物のうち10 μ l を大腸菌 JM109 のコンピテント細胞 100 μ l に加え、氷上で30分間、42°C にて1分間そして再び氷上で1分間静置した。次いで400 μ l のSOC 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) を加え、37
20 °C にて30分間保温した後50 μ g/ml のアンピシリンを含むLB寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 上にこの大腸菌を広げ、37°C にて16時間保温して大腸菌形質転換体を得た。

現われた形質転換体のうち5クローンについてそれぞれを50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地5ml中で37°Cにて16時間培養し、その培養物からアルカリ法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にてプラスミドDNAを調製した。それぞれの挿入塩基配列をSequenase Version 2.0 (United States Biochemical社製)を用いてジデオキシ・シーケンシング法にて決定したところ、配列番号6に示したようにプライマーK4S及びK4-2Aに挟まれた40塩基対の配列が明らかとなった。

この塩基配列をもとにセンス・プライマー7D-1S: 5'-CTCTCAACAGAGCA GCTGCG-3'及び7D-3S: 5'-CTGGCTCACCGGCTCTCTGA-3'とアンチセンス・プライマー7D-1A: 5'-AGAGCCGGTGAGCCAGACAG-3'及び7D-2A: 5'-GCGCAGCTCTCTGTTGAGA-3'を合成した。上記と同様の条件でライブラリーDNAを鋳型にT7と7D-1S及びT3-2と7D-1Aの組合せで一段階目のPCRを行なった。さらに二段階目のPCRをそれぞれプライマーT7と7D-3S及びT3-2と7D-2Aの組合せで行なった。

PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分析し、増幅されたDNA断片を含むゲル部分を切出し、Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia社製)を用いてDNAを抽出した。これらのDNAについてfmol DNA Sequencing System (Promega社製)を用いて直接塩基配列を決定したところ、配列番号7及び8に示したように本因子をコードする遺伝子の一部が確認された。

この塩基配列をもとにセンス・プライマー3AS1: 5'-AACTCCTTGGCTTCCC GTGTG-3'とアンチセンス・プライマー7SA1-5'-CGCATCTGGGTTGAGGAA TAG-3'を合成し、上記の条件でプールDについてPCRを行なったところ197塩基対 (配列番号9)のDNA断片の増幅が確認され、このDNA断片がコードするアミノ酸配列は実施例3で得た精製Meg-POTを用いて決定したアミノ酸配列と一致した。このDNA断片 (Q197A)を以下のスクリーニングにプローブとして用いた。

実施例8. cDNAライブラリーのプローブQ197Aによるスクリーニング

実施例5で得られたpoly (A)⁺RNA 5 μ gを材料としてZAP-cDNA SYNTHESIS KIT (Stratagene社製)を用いて二本鎖cDNAを合成し、 λ ZA

PIIベクター (Stratagene社製) のアームに連結した。これをGigapack Gold II packaging extract (Stratagene社製) を用いてパッケージングし、新たにHPC-Y5細胞のcDNAライブラリーを構築した。

5 実施例7のPCRで増幅された197bpのDNAをアクリルアミドゲル電気泳動後ゲルから回収し、このDNA断片Q197AをランダムプライマーDNAラベリングキット (宝酒造社製) を用いて³²Pで標識した。但し、添付のランダムプライマーの代りにプライマー3AS1及び7SA1を400nMの濃度で用い標識した。遊離のdNTPはNICK-Column(Pharmacia社製)に通搭して除いた。
10 次に、BentonとDavisの方法(Science 196, 180, 1977)に準じてブランクハイブリダイゼーションを行なった。

ファージブランクの生じた寒天培地上にHybond-N+フィルター (Amersham社製) をのせてファージを移し、以下の順序でフィルターを処理した。1. 5M塩化ナトリウムを含む0.5N水酸化ナトリウム水溶液にて5分間DNAを変性させ、1.5M塩化ナトリウムを含む0.1N水酸化ナトリウム水溶液で1分間続
15 いて1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で1分間2回、最後に2×SSCP (240mM NaCl, 30mM Na₃ citrate, 26mM KH₂PO₄, 2mM EDTA) で1分間処理した。

次いでフィルターを乾燥し、0.4N水酸化ナトリウム水溶液で20分間、5×SSPE (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) で1分間2回処理した。50%ホルムアミド、5×SSPE、5×Denhardt's Solution (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 0.1% SDS及び0.1mg/ml変性DNA (鮭精巢DNA, Boehringer Mannheim社製) を含むプレハイブリダイゼーション溶液中で42℃、4時間保温した。
20

25 上記の様にして標識したQ197Aプローブを含むハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド、5×SSPE、5×Denhardt's Solution, 0.1mg/ml変性DNA (鮭精巢DNA), 0.1% SDS) 中で42℃にて16時間ハイブリダイゼーションを行なった。フィルターを室温下に0.05% SDSを含む2×SSCで1時間2回洗浄し、次いで68℃で0.1% SDSを含む1×SSCで1時間2回、さらに68℃で0.1% SDSを含む0.2×SSCで1時
30

間洗浄した後、オートラジオグラフィーで検出した。

その結果、23個の陽性ファージクローンが得られた。得られたファージクローンのうち完全長cDNAを含むと思われるクローンについてヘルパーファージR408を用いてプラスミドへの切出しをZAP-cDNA SYNTHESIS KIT (Stratagene社製)添付の処方に従って行なった。得られたプラスミドpKPO27 (図2)についてクローン化DNAの塩基配列をSequenase Version 2.0 (United States Biochemical社製)を用いてジデオキシ・シーケンシング法にて調べたところ、配列番号10に示す塩基配列が得られた。また、他のプラスミドpKPO21についてクローン化DNAの塩基配列を同様の方法で調べたところ、配列番号10に示す塩基配列の内、1873番目のG (グアニン) がA (アデニン) に変化しており (従って593番目のVal (バリン) がMet (メチオニン) に変化している)、配列の他の部分はpKPO27のそれと同一であった。

これらの塩基配列およびそれらによりコードされているアミノ酸配列をGen Bank Re 1.71により調査したところ、塩基配列及びアミノ酸配列はいずれも新規であることが確認された。

なお、前記プラスミドpKPO27を含有する大腸菌はEscherichia coli JM109 (pKPO27)、およびプラスミドpKPO21を含有する大腸菌はEscherichia coli JM109 (pKPO21)として工業技術院微生物工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、各々、平成4年10月12日に微工研条寄第4029号 (FERM BP-4029)、および平成4年11月10日に微工研条寄第4071号 (FERM BP-4071)としてブダペスト条約に基き国際寄託された。

実施例9. pRVHKPO27ベクターの構築 (動物細胞用)

実施例8で得られたpKPO27を10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 中37℃にて制限酵素EcoRI (宝酒造社製)で2時間処理しエタノール沈殿としてDNAを回収し、さらに10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KClを含む20mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 中37℃にて制限酵素BamHI (宝酒造社製)で2時間処理した後、アガロースゲル電気泳動を行ない1.8kbpのDNA断片を回収した。

ベクターHEF-12h-g γ 1を上記と同様に制限酵素EcoRI及びBamHIにて処理した後アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）を加えて65℃にて2時間保温することにより脱リン酸してアガロースゲル電気泳動を行ない回収した8.7 kbp DNAを先の1.8 kbpのDNA断片と混合後6.6 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATPを含む66 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）中16℃にてT4 DNAリガーゼを一晩反応させ、これを大腸菌JM109株に導入してpRVHKPO27を得た（図3）。

図3に示されるごとくこのプラスミドはEF1 α プロモーター、ヒトイムノグロブリンH鎖定常領域遺伝子、SV40エンハンサープロモーター、pBR322由来の複製開始領域および β -ラクタマーゼ遺伝子（Amp^r）を含みEF1 α プロモーターとヒトイムノグロブリンH鎖定常領域遺伝子の間にヒトMe g-POT cDNAの一部が接続されている。

なお、前記ベクターHEF-12h-g γ 1は次の様にして作製した。

ベクターHEF-12h-g γ 1の構成要素である2.5 kbpのHEF-1 α プロモーター-エンハンサー領域は、該遺伝子の5'-末端に接する約1.5 kbpのDNA、第一エクソン中の33 bp、第一イントロン中の943 bp、及び第二エクソンの最初の部分の10 bpから成る。この2.5 kbpのHindIII-EcoRI断片をプラスミドpEF321-CAT(D.W.Kimら、Gene 91, 217 (1990); 及びT. Uetsukiら、J. Biol. Chem. 264, 5791 (1989))から切り出し、そしてp dKCRベクター(M. Tsuchiyaら、Embo J. 6, 611 (1987)), K. O' Haraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1527 (1981), (R. Fukunaga ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 5086 (1984))にクローニングして、SV40前期プロモーター-エンハンサーを含有する約300 bpのHindIII-EcoRI断片と置き換えてpTEF-1を得た。

pTEF-1をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そしてHindIII リンカーに連結した。次に、この修飾されたpTEF-1ベクターDNAから約1.6 kbpのHindIII-SmaI断片を切り出した。

HCMV-12h-g γ 1(Maedaら、Human Antibodies and Hybridomas 2, 124 (1991); C.A. Kettleboroughら、Protein Engineering 4, 773 (1991))

をEcoRIにより部分消化し、Klenowポリメラーゼによりフィラーインし、そして自己連結することにより、HCMV-12h-g γ 1からプラスミドHCMV-12h-g γ 1 (Δ E2)を作製した。

5 プラスミドHCMV-12h-g γ 1 (Δ E2)をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィラーインし、そしてHindIIIで消化した。ヒト α -I C領域をコードするDNA配列を含有する約7 kbpの断片を、HEF-1 α プロモーター-エンハンサーを含有する前記の1.6 kbp HindIII-SmaI断片に連結してHEF-12h-g γ 1を得た。このベクター中のHEF-1 α プロモーター-エンハンサー領域は、5'-領域に接する380 bpのDNAを除き、pTEF-1中のそれと同一であった。

10 実施例10. COS細胞での巨核球増幅因子(Meg-POT)遺伝子の発現I

COS細胞を 1×10^7 個/mlになるようにPBSに懸濁し、この細胞浮遊液0.8 mlにpRVHKPO27 10 μ gを加えた。1900 V、25 μ F、0.4 msecの条件でGenePulsar (BioRad社製)を用いて電気穿孔法(electroporation)によりプラスミドをCOS細胞に導入した。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーションした細胞を1%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Minimum Essential Medium(DMEM) (GIBCO社製) 25 mlに加えた。72時間培養後、培養上清を集めた。

こうして得られたCOS細胞の培養上清の一部をセントリプレッシャー10 (Amicon社製)で約10倍に濃縮し、SDS/PAGEにて分析した。コントロールとして同様に無処理のCOS細胞およびベクターのみ導入したCOS細胞の培養上清も同様にそれぞれ約10倍に濃縮したものについても並べて泳動した。ゲル濃度は12%で、Laemmliの方法Nature, 227, 680 (1970)に従って泳動し、一枚は2D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学薬品製)を用いて蛋白質を染色した。

25 なお分子量マーカーはバイオラッド社製低分子量マーカー(ホスホリラーゼB (92.5 kd)、ウシ血清アルブミン(66.2 kd)、オボアルブミン(45.0 kd)、炭酸脱水素酵素(31.0 kd)、大豆トリプシンインヒビター(21.5 kd)、リゾチーム(14.4 kd))を用いた。

30 もう一枚はウェスタンブロット法により巨核球増幅因子を検出した。

このときの分子量マーカーは、バイオラッド社製プレステインド分子量マーカー（ホスホリラーゼ B（106.0kd）、ウシ血清アルブミン（80.0kd）、オボアルブミン（49.5kd）、炭酸脱水素酵素（32.5kd）、大豆トリプシンインヒビター（27.5kd）、リゾチーム（18.5kd））を用いた。一次抗体は、HPC-Y5の培養上清より精製した巨核球増幅因子のN末端配列分析より得られた配列をもとに合成した18残基のペプチドを抗原として家兎に免疫して得たポリクローナル抗体を用いた。

その結果、銀染色法により染色されたバンドを3者で比較したところ、分子量約33,000にみられたバンドは巨核球増幅因子の遺伝子を導入したCOS細胞の培養上清にのみ認められた。さらに、ウェスタンブロット法でもこの分子量約33,000のバンドのみ強く発色したことから、このバンドが組換え型巨核球増幅因子であると考えられた。

実施例11. COS細胞の培養上清中の巨核球増幅因子（Meg-POT）活性測定I

15 実施例10で得られたCOS細胞の培養上清の巨核球増幅因子活性を前述した方法に従って測定した。但し、COS細胞への遺伝子の導入刺激で、その培養上清中にIL-6が誘導されることが知られているので、測定はマウスIL-6受容体に対する抗体を添加した系で行った。

20 その結果、表2に示したように、遺伝子を導入しなかった無処理のCOS細胞の培養上清もMeg-POTのcDNAを含まないベクターを導入した対照COS細胞の培養上清も巨核球増幅因子活性を示さなかったが、Meg-POTのcDNAを含むベクターを導入したCOS細胞の培養上清は明らかに巨核球増幅因子活性を示した。

[表 2]

C O S 細胞の培養上清中の巨核球増幅因子活性

C O S 細胞	巨核球増幅因子活性 ^{a)}		
	培養上清濃度 (%)	5 0	0 . 5 0 . 0 0 5
無処理 C O S		1 . 5	3 N D ^{b)}
対照 C O S		0	2 . 5 N D
Meg - POT . cDNA 導入 C O S		8 . 5	7 3 . 5

a) 形成されたコロニー数から I L - 3 単独で形成されたコロニー数 (2 6 . 5 個) を引いた値。

b) 測定せず。

実施例 1 2 . C O S 細胞の培養上清からの組換え型巨核球増幅因子 (M e g - P O T) の精製 I

実施例 1 0 で得られた C O S 細胞の培養上清 3 5 0 ml に Tween 2 0 を終濃度が 0 . 0 1 % になるように加え、 Amicon P M - 1 0 (Amicon 社製) を用いた限外
5 濾過法により約 1 0 倍濃縮した。この濃縮液から以下の手順で組換え型巨核球増幅因子 (M e g - P O T) を精製した。

(i) 0 . 0 1 % Tween 2 0 を含む 1 0 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8 . 4) 、 1 0 l に対し前記濃縮液を一晩 4 ° C にて透析した後、同緩衝液にて平衡化した D E A E - Sepharose fast flow カラム (2 . 2 × 1 8 cm , Pharmacia 社製) に添加
10 した。カラムを同緩衝液で洗浄後、同緩衝液中、 N a C l 濃度を段階的に 0 , 0 . 1 , 0 . 1 5 , 0 . 2 , 0 . 5 M と上げてカラムに吸着した蛋白質を溶出させた。得られた画分を S D S / P A G E で分析した結果、実施例 1 0 で認めた分子量約 3 3 , 0 0 0 のバンドは N a C l 濃度が 0 . 1 M の画分の前半部分にのみ検

出された。この画分を集め、次の逆相HPLCでの精製にかけた。

- (ii) 上記画分に10% TFAを加えpHを3以下とした後、0.1% TFAを含む24%アセトニトリルで平衡化したVydac C4カラム(4.6×250mm)に添加し、同溶離液にてカラムを洗浄後、0.1% TFA中アセトニトリル濃度を80分間に24~64%、さらに10分間に80%まで直線的に上げてカラムに吸着した蛋白質を溶出させた。流速は約1ml/minで、蛋白質の検出は220nmおよび280nmの二波長で行った。得られたピークについてSDS/PAGEで分析した結果、アセトニトリルの濃度で約41%に分子量約33,000のバンドが認められた。この画分を0.1% TFAで希釈した後、再び同条件で逆相HPLCを行い、メインピークを回収した。

実施例13. 組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)のアミノ酸配列分析

- 実施例12で得られた組換え型Meg-POTについて、気相式プロテインシーケンサ473A型(Applied Biosystems社製)を用いてN末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、以下に示す(a)~(c)の3種類のN末端アミノ酸配列が認められ実施例10で認めた分子量約33,000のバンドが組換え型巨核球増幅因子であることが確認された。

(a) Ser-Arg-Thr-Leu-Ala-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-Asp-
..... (配列番号11)

(b) Leu-Ala-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-Asp-Gly-Val-Leu-
Ala-Asn-Pro-Pro-Xaa-Ile-Ser-Xaa-Leu-Xaa-Pro-Arg-.....

(c) Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-Asp-Gly-Val-Leu-Ala-Asn-
Pro-Pro-Xaa-Ile-Ser-Xaa-Leu-Xaa-Pro-Arg-Gln-Leu-.....

これらの内、(b)および(c)は実施例4(i)における、HPC-Y5細胞の培養上清からのポリペプチドの配列-1(配列番号:1)および配列-3(配列番号:3)にそれぞれ対応する。

- また、組換え型Meg-POTに10mg/mlの臭化シアンを含む70%ギ酸溶液100μlを加え、室温にて24時間臭化シアン分解した後、遠心濃縮機にて過剰の試薬を除いた。その残渣を0.1% TFA 1mlに溶解し、0.1% TFAで平衡化したVydac C4カラム(4.6×250mm)に添加し、0.1% TFA中、アセトニトリル濃度を40分間に80%まで直線的に上げ、カラムに吸着

した臭化シアン断片を溶出させた。得られた断片のうちC末側の断片について気相式プロテインシーケンサー473A型を用いてアミノ酸配列分析を行ったところ、以下に示す配列が得られた。この配列は、HPC-Y5の培養上清から得られた巨核球増幅因子(Meg-POT)を同様に臭化シアン分解して得られた臭化シアン断片の部分配列と、次記に示すごとく一致した。

[表3]

	5	10	15	20
cDNA	:Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Leu-Leu-Pro-Val-Leu-Gly-Gln-Pro-Ile-Ile-Arg-Ser-Ile-Pro-Gln-			
COS	:Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Leu-Leu-Pro-Val-Leu-Gly-Gln-Pro-Ile-Ile-Arg-Ser-Ile-Pro-Gln-			
HPC-Y5	:Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Leu-Leu-Pro-Val-Leu-Gly-Gln-Pro-Ile-Ile-.....			
	25	30	35	40
cDNA	:Gly-Ile-Val-Ala-Ala-Trp-Arg-Gln-Arg-Ser-Ser-Arg-Asp-Pro-Ser-Trp-Arg-Gln-Pro-Glu-			
COS	:Gly-Ile-Val-Ala-Ala-Trp-Arg-Gln-Arg-Ser-Ser-Xaa-Asp-Pro-Xaa-Trp-Xaa-Gln-.....			

上表の「cDNA」表記のアミノ酸配列はMeg-POTをコードするcDNAの塩基配列から演えきされるアミノ酸配列であり、また「COS」表記のアミノ酸配列はMeg-POTをコードするcDNAをCOS細胞で発現させた蛋白質を、アミノ酸配列分析で得られた部分配列であり、さらに「HPC-Y5」表記のアミノ酸配列は、ヒト脾臓癌細胞由来の株化細胞「HPC-Y5」の培養上清から得られたMeg-POTのアミノ酸配列分析で得られた部分配列である。

実施例14. pRVHKPO27fベクターの構築(動物細胞用)

実施例8で得られたpKPO27を10mM MgCl₂, 1mM DTTおよび100mM NaClを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中37℃にて制限酵素XhoI(東洋紡社製)で2時間処理しエタノール沈殿としてDNAを回収した。次に5mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTPを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)中10℃にてDNAポリメラーゼのKlenow断片で1時間処理し末端を平滑化した。エタノール沈殿としてこのDNAを回収し、次いで10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM NaClを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中37℃にて制限酵素SalI(東洋紡社製)で2時間処理しアガロースゲル電気泳動を行ない、1.3KbpのDNA断片を回収した。

実施例 9 で得られた pRVHKPO27 を 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM KCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中 37 °C にて制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で 2 時間処理した後エタノール沈殿として DNA を回収した。次に 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中 10 °C
5 にて DNA ポリメラーゼの Klenow 断片で 1 時間処理し末端を平滑化した。

エタノール沈殿としてこの DNA を回収し、次いで 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中 37 °C にて制限酵素 SalI (東洋紡社製) で 2 時間処理し、アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) を加えて 65 °C にて 2 時間保温することにより脱リン酸してアガロースゲル電気泳動を行ない 8.5 Kbp の DNA 断片を回収した。この 8.5 Kbp の DNA 断片と先の 1.3 Kbp の DNA 断片とを混合した後、6.6 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP を含む 66 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中 16 °C にて T4 DNA リガーゼを一晩反応させ、これを大腸菌 JM109 株に導入して pRVHKPO27f を得た (図 4)。
15

なお pRVHKPO27f は、図 4 に示されるごとく、EF1 α プロモーター、ヒトイムノグロブリン H 鎖定常領域遺伝子、SV40 エンハンサープロモーター、pBR3 ϕ 2 由来の複製開始領域および β -ラクタマーゼ遺伝子 (Amp^r) を含み、ヒト Meg-POTc DNA は EF1 α プロモーターとヒトイムノグロブリン H 鎖定常領域遺伝子の間に接続されている。
20

実施例 15. COS 細胞での巨核球増幅遺伝子 (Meg-POT) 遺伝子の

発現 II

COS 細胞を 1×10^7 個/ml になるように PBS に懸濁し、この細胞浮遊液 0.8 ml に pRVHKPO27f 10 μ g を加えた。1900 V, 25 μ FD 0.4 msec の条件で GenePulsar (BioRad 社製) を用いて電気穿孔法 (electroporation) によりプラスミドを COS 細胞に導入した。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーションした細胞を 1% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (GIBCO 社製) 25 ml に加えた。72 時間培養後、培養上清を集めた。
25

30 こうして得られた COS 細胞の培養上清の一部をセントリプレップ-10 (Am

- icon社製)で約10倍に濃縮し、SDS/PAGEにて分析した。コントロールとしてベクターのみ導入したCOS細胞の培養上清も同様にそれぞれ約10倍に濃縮したものについて並べて泳動した。ゲル濃度は12%で、Laemmliの方法Nature, 227, 680(1970)に従って泳動し、一枚は2D-銀染色試薬・II「第1」
- 5 (第1化学薬品製)を用いて蛋白質を染色した。
- なお分子量マーカーはバイオラッド社製低分子量マーカー〔ホスホリラーゼB(92.5kd)、ウシ血清アルブミン(66.2kd)、オボアルブミン(45.0kd)、炭酸脱水素酵素(31.0kd)、大豆トリプシンインヒビター(21.5kd)、リゾチーム(14.4kd)〕を用いた。
- 10 もう一枚はウェスタンブロット法により巨核球増幅因子を検出した。
- このときの分子量マーカーは、バイオラッド社製プレステインド分子量マーカー〔ホスホリラーゼB(106.0kd)、ウシ血清アルブミン(80.0kd)、オボアルブミン(49.5kd)、炭酸脱水素酵素(32.5kd)、大豆トリプシンインヒビター(27.5kd)、リゾチーム(18.5kd)〕を用いた。一次抗
- 15 体は、HPC-Y5の培養上清より精製した巨核球増幅因子のN末端配列分析より得られた配列をもとに合成した18残基のペプチドを抗原として家兎に免疫して得たポリクローナル抗体を用いた。
- その結果、銀染色法により染色されたバンドを両者で比較したところ、分子量約33,000にみられたバンドは巨核球増幅因子の遺伝子を導入したCOS細胞の培養上清にのみ認められた。さらに、ウェスタンブロット法でもこの分子量
- 20 約33,000のバンドのみ強く発色したことから、このバンドが組換え型巨核球増幅因子であると考えられた。

実施例16. COS細胞の培養上清中の巨核球増幅因子(Meg-POT)

活性測定II

- 25 実施例15で得られたCOS細胞の培養上清の巨核球増幅因子活性を前述した方法に従って測定した。但し、COS細胞への遺伝子の導入刺激で、その培養上清中にIL-6が誘導されることが知られているので、測定はマウスIL-6受容体に対する抗体を添加した系で行った。
- その結果、表4に示したように、遺伝子を導入しなかった無処理のCOS細胞
- 30 の培養上清もMeg-POTのcDNAを含まないベクターを導入した対照CO

S細胞の培養上清も巨核球増幅因子活性を示さなかったが、Meg-POTのcDNAを含むベクターを導入したCOS細胞の培養上清は明らかに巨核球増幅因子活性を示した。

[表4]

COS細胞の培養上清中の巨核球増幅因子活性

C O S細胞	巨核球増幅因子活性 ^{a)}			
	培養上清濃度 (%)	2	0 . 2	0 . 0 2
無処理 C O S	0	N D ^{b)}	N D	N D
対照 C O S	2	N D	N D	N D
Meg - P O T cDNA 導入 C O S	7	4	7	1

a) 形成されたコロニー数からIL-3単独で形成されたコロニー数(10個)を引いた値。

b) 測定せず。

実施例17. COS細胞の培養上清からの組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)の精製II

実施例15で得られたCOS細胞の培養上清350mlにTween 20を終濃度が0.01%になるように加え、Amicon PM-10 (Amicon社製)を用いた限外濾過法により約10倍濃縮した。この濃縮液から以下の手順で組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)を精製した。

- 5 (i) 0.01% Tween 20を含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.4)、101に対し前記濃縮液を一晩4℃にて透析した後、同緩衝液にて平衡化したDEAE-Sepharose fast flow カラム(2.2×18cm, Pharmacia 社製)に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄後、同緩衝液中、NaCl濃度を段階的に0, 0

1, 0.15, 0.2, 0.5 Mと上げてカラムに吸着した蛋白質を溶出させた。得られた画分をSDS/PAGEで分析した結果、実施例15で認めた分子量約33,000のバンドはNaCl濃度が0.1 Mの画分に検出され、この画分を次の逆相HPLCでの精製にかけた。

- 5 (ii) 上記画分に10% TFAを加えpHを3以下とした後、0.1% TFAを含む24%アセトニトリルで平衡化したVydac C4カラム(4.6×250 mm)に添加し、同溶離液にてカラムを洗浄後、0.1% TFA中アセトニトリル濃度を80分間に24~64%、さらに10分間に80%まで直線的に上げてカラムに吸着した蛋白質を溶出させた。流速は約1 ml/minで、蛋白質の検出は220
10 nmおよび280 nmの二波長で行った。得られたピークについてSDS/PAGEで分析した結果、アセトニトリルの濃度で約41%に分子量約33,000のバンドが認められた。この画分を0.1% TFAで希釈した後、再び同条件で逆相HPLCを行い、メインピークを回収した。

実施例18. 精製組換え型Meg-POTの巨核球増幅因子活性測定

- 15 実施例17で精製された組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)を10%ウマ血清を含むIscove's Modified Dulbecco's培養液(IMDM)で所定濃度(50.1, 3.1, 0.2 ng/ml)に希釈した被検検体0.1 ml, ウマ血清(56°C 30分処理、Biocell社製)0.2 ml、マウス(C57BL/6N系雄性、6~12週齢)大腿骨骨髓細胞浮遊液0.1 ml(2×10^5 有核細胞)、組換
20 え型マウスIL-3を5 ng/mlを含むIMDM 0.2 ml、および寒天を0.75%含む改変McCoy's 5A培養液0.4 mlを混合した。次いで、これらを直径3.5 mmの組織培養プラスチックディッシュに入れて固まらせたのち、37°C、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件で培養を行った。

- 培養6日目に寒天層ごとスライドガラス上に取出し乾燥させ、フィルム状標本
25 としてのものを5%グルタルアルデヒドで固定し、Nakeffらの方法(Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151 587 1976)にしたがって、アセチルコリンエステラーゼで染色し、巨核球コロニー数の算定を行った。この際、アセチルコリンエステラーゼ染色陽性細胞を4個以上含む集塊を巨核球コロニーとした(コロニーの検鏡は40倍の倍率で行なった)。

- 30 なお、巨核球増幅因子活性は、組換え型Meg-POTを添加して生じた巨核

球コロニー数と組換え型Meg-POT無添加（10%ウマ血清を含むIMDMのみ添加）で組換え型IL-3単独で生じた巨核球コロニー数との差を指標とした。

5 その結果、表5に示したように、精製組換え型Meg-POTは巨核球増幅因子活性を示した。

[表5]

精製組換え型Meg-POTの巨核球増幅因子活性

Meg-POT濃度 (ng/ml) ^{a)}	巨核球増幅因子活性 ^{b)}
50.1	9.5
3.1	8.5
0.2	3

a) アミノ酸分析法により測定。

b) 形成されたコロニー数からIL-3単独で形成されたコロニー数（19.5）を引いた値。

実施例19. 巨核球増幅因子（Meg-POT）をコードする遺伝子の試験管内転写翻訳

実施例8で得られたpKPO27を10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KClを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH8.5）中37℃にて制限酵素10 XhoI（東洋紡社製）で2時間処理し、次いでアガロースゲル電気泳動を行ない、1.9KbpのDNA断片を回収した。ベクターpCITE-2c（Novagen社製）を10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KClを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH8.5）中37℃にて制限酵素XhoI（東洋紡社製）で2時間処理した後アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）を加えて65℃にて2

時間保温することにより脱リン酸して得られたDNAをフェノール処理を行なうことにより精製した。これと先の1.9KbpのDNA断片と混合後、6.6mM MgCl₂, 5mM DTT, 1mM ATPを含む66mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中16°CにてT4DNAリガーゼを一晩反応させ、大腸菌JM109株に導入してpCITE・KPO27を得た(図5)。

pCITE・KPO27を10mM MgCl₂, 1mM DTTを含む10mM Tris-HCl(pH7.5)中37°Cにて制限酵素NaeI(東洋紡社製)で2時間処理した後、DNAをフェノール処理を行なうことにより精製した。この類型DNAに2mM spermidine, 6mM MgCl₂, 10mM NaCl, 1単位/μl RNasin ribonuclease inhibitor(Promega社製)、0.5mMのATP, GTP, CTP, UTPを含む40mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中37°CにてT7 RNA Polymeraseを反応させて転写を行なった。これをフェノール処理を行なうことにより精製し、エタノール沈殿としてRNAを回収した。つづいてRed Nova Lysate(Novagen社製)を用いて³⁵S-メチオニンを含む標識体としてRNAを翻訳させた。この反応物をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーをとったところ約70,000の分子量のバンドが認められた。

実施例20. pMBPKPO27ベクターの構築(大腸菌用)

実施例8で得られたpKPO27を10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KClを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)中37°Cにて制限酵素XhoI(東洋紡社製)で2時間処理しエタノール沈殿としてDNAを回収し、5mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTPを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)中10°CにてDNAポリメラーゼのKlenow断片で1時間処理し末端を平滑化した。次いでアガロースゲル電気泳動を行ない、1.9KbpのDNA断片を回収した。

ベクターpMAL-c(New England Biolabs社製)を10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中37°Cにて制限酵素StuIで2時間処理した後アルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)を加えて65°Cにて2時間保温することにより脱リン酸した。DNAをフェノール処理を行なうことにより除蛋白し、エタノール沈殿として回収した。

これと先の1.9KbpのDNA断片と混合後6.6mM MgCl₂, 5mM DTT, 1mM ATPを含む66mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)中16℃にてT4 DNAリガーゼを一晩反応させ、これを大腸菌JM109株に導入してpMBPKPO27を得た(図6)。図6に示されるごとくこのプラスミドは発現ユニットとしてtacプロモーターの下流にマルトース結合蛋白質(MBP)遺伝子(malEΔ2-26)、Factor Xaの認識配列およびMeg-POTの34番めのアミノ酸Ser以降のcDNAがフレームが一致するように接続されている。

実施例21. 大腸菌JM109株での融合蛋白質の発現

10 実施例20においてpMBPKPO27で形質転換した大腸菌を50ug/mlのアンピシリンおよび0.2%グルコースを含むLB培地5ml中で37℃にて16時間培養し、この培養液4mlを50ug/mlのアンピシリンおよび0.2%グルコースを含むLB培地400mlに加えた。37℃にて約2時間培養後、0.3mMになるようにイソプロピル-β-D-チオガラクトシドを加えさらに3時間培養を
15 続けた。この培養菌体を実施例10と同様にSDSポリアクリルアミド電気泳動にかけ、上記抗Meg-POTペプチド血清または抗MBP血清によるウェスタンブロッティングをおこなったところMBPとMeg-POTの融合蛋白質の発現が確認された。

20 発現された組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)を菌体より下記のとおり精製した。

10mM EDTAを含む20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中、超音波処理(20分間)により破碎した懸濁液を遠心操作(10,000rpm x 30min, 4℃, SA 600ローター、Sorvall社製)にかけ、集めた沈澱を蒸留水に懸濁した。懸濁液を再び遠心操作(10,000g x 90min)にかけ、集めた沈澱を1% 2-メルカプトエタノール(2-ME)及び8M尿素を含む25mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶解し、再び遠心操作(35,000rpm x 60min)を行い不溶物を除去した後、10mM 2-ME, 10mM EDTA, 200mM NaClを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)で2倍希釈した。この溶液を同緩衝液にて平衡化したアミロースカラム(75ml, BioLabs社製)に添加し、同緩衝液にてカラムを洗浄した。10mM マルトースを含む同緩衝液にてカラムに
30 結合している蛋白を溶出させた。この画分をFactor Xaの消化緩衝液である2mM

CaCl₂及び150mM NaClを含む20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)に対して透析した。
 。透析内液にFactor Xaを加え、37°Cで16時間酵素消化した。反応液を、メンブ
 ランフィルターPM-10 (アミコン社製)にて濃縮後、上記アミロースカラム
 の平衡化緩衝液で平衡化したPD-10カラムに通した後、再びアミロースカラム
 5 に添加し、同緩衝液にてカラムを洗浄して、素通り画分及び洗浄画分を集めた。
 。セントリプレッシャー10にて上記画分を濃縮した。

このようにして得た組換え型巨核球増幅因子を、Freundの完全アジュバ
 ンドとともに家兎に2週間ごとに5回感作した。最終感作後10日目に、けい動
 脈より全採血し、抗巨核球増幅因子抗血清を得た。

10 実施例22. pEFDKPOfベクターの構築 (動物細胞用)

pKPO27を10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KClを含む
 20mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)中37°Cにて制限酵素EcoRI、Bam
 HI (宝酒造社製)で処理した後、アガロースゲル電気泳動を行い1.8kbp
 のDNA断片を回収した。

15 ベクターDHFR-ΔE-RVhをEcoRI、BamHIにて同様に処理した
 後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製)で60°C、2時間処理することに
 より脱リン酸してアガロースゲル電気泳動を行ない回収した7kbp DNAを先
 の1.8kbpのDNA断片と連結させpEFDKPO5'を得た。

これを10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KClを含む20mMトリ
 20 ス塩酸緩衝液(pH 8.5)中37°Cにて制限酵素BamHI処理した後、6.
 7mM MgCl₂、16.6mM(NH₄)₂SO₄、10mM 2-メルカプトエタノ
 ール、6.7mM EDTA、330mM dNTPを含む67mMトリス緩衝液中3
 7°C、5分間T4DNAポリメラーゼで処理し末端を平滑化した。さらにKpn
 Iリンカー (Amersham社製)と連結しpEFDKPO5'Kを得た。新

25 たにpKPO27を10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KClを含
 む20mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)中37°Cにて制限酵素XhoIで切断
 後、6.7mM MgCl₂、16.6mM(NH₄)₂SO₄、10mM 2-メルカプ
 トエタノール、6.7mM EDTA、330mM dNTPを含む67mMトリス緩
 衝液中37°C、5分間T4DNAポリメラーゼで処理し末端を平滑化した。これ
 30 をさらに10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaClを含む50mM

トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中37℃にて制限酵素SalIで処理しアガロースゲル電気泳動を行い1.3kbpのDNA断片を回収した。ベクターpCDM8(Invitrogen社製)を10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KClを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)中37℃にて制限酵素XhoIで処理した後さらに10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KClを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)中37℃にて制限酵素HpaIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行ない回収した3.3kbp DNAを先の1.3kbpのDNA断片と連結しpCDMKPO3'を得た。pEFDKPO5'KとpCDMKPO3'を10mM MgCl₂、1mM DTTを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中37℃にて制限酵素KpnIで処理しアガロースゲル電気泳動を行ない、それぞれ10kbp、0.9kbpの断片を回収3して、これらを連結しpEFDKPOfを得た(図7)。図に示されるごとくこのプラスミドはジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)を含みEF1 α プロモーターとSV40polyAシグナルの間にヒトMeg-POT cDNAが接続されている。

なお、前記ベクターDHFR- Δ E-RVhは国際公開WO92/19759号公報に記載のDHFR- Δ E-PMh-g71及びRVh-PM1f-4を用いて次の様に作製した。

DHFR- Δ E-PMh-g71及びRVh-PM1f-4を10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、0.01%BSAを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)中37℃にて制限酵素PvuI, BamHI(宝酒造社製)で処理しアガロースゲル電気泳動を行い4kbp、3kbpの断片を回収して、これらを連結することによりDHFR- Δ E-RVhを作製した。

実施例23. CHO細胞での巨核球増幅因子(Meg-POT)遺伝子の発現

CHO細胞DXB-11を 1×10^7 個/mlになるようにphosphate-buffered saline(PBS)に懸濁し、この細胞浮遊液0.8mlにpEFDKPOfを10 μ g加えた。1900V、25 μ Fの条件でGenePulsar(Bio Rad社製)を用いて電気穿孔法(electroporation)によりプラスミドをCHO細胞に導入した。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーションした細胞を10%ウシ胎児血清を

含む α -MEM培地（GIBCO社製）25mlに加えた。37℃、24時間培養後、トリプシン処理にて回収した細胞を100倍に希釈し、10%ウシ胎児血清添加リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシド非含有 α -MEM培地（GIBCO社製）で3週間培養した。この時3～4日に一度の割合で培地交換を行った。コロニーが肉眼で確認できるまでに成長したのでクローンを拾い、クローン毎に培養を続けた。その後、先の培地にmethotrexate（MTX）（Sigma社製）を添加し、選択培養を続けた。一次選択時のMTX濃度は10nMとし、得られた耐性クローンに対してMTX濃度50nMの培地で二次選択を行った。最終的に得られたクローンを50nM MTX及び2%FCSを含むIMDM培地（GIBCO社製）にて大量培養し、その培養上清を精製に供した。

培養上清をSDS/PAGEにて分析し、N末近傍の合成ペプチドを抗原として作製した抗体を用いたウェスタンブロッティング法によりMeg-POTを検出した。なお、分子量マーカーとしては、実施例15に示すバイオラッド社製プレスティンド分子量マーカーを使用した。図8に示すように、分子量約33kd、30kd、27.5kdに3本のバンドが検出された。

実施例24. CHO細胞の培養上清からの組換え型巨核球増幅因子（Meg-POT）の精製I

実施例23で調製したCHO細胞の培養上清10lにTween20を、終濃度が0.01%になるように加え、5 μ mのメンブランフィルター（富士フィルム社製）を通して不溶物を除去した。この培養上清から以下の手順により組換え型巨核球増幅因子を精製した。

(i) 上記培養上清を0.01% Tween 20及び0.2M NaClを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH 8）で平衡化したBlue-Sepharose fast flowカラム（5.0 \times 20cm、Pharmacia社製）に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄した後、0.01% Tween 20及び2M KClを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH 9）でカラムに吸着した蛋白を溶出させた。この画分を集め、ミニタン（millipore社製）にて濃縮し、0.01% Tween 20を含む20mM酢酸緩衝液（pH 5）を加えて希釈する操作を繰り返し脱塩した後、生じた不溶物を遠心操作（10,000r

pm × 30 min) により除去した。上清を次のカチオン交換クロマトグラフィーでの精製にかけた。

(ii) 0.01% Tween 20を含む20 mM酢酸緩衝液 (pH 5) で平衡化したS-Sepharose fast flowカラム (5.0 × 12 cm) に上記画分を添加し、同緩衝液にてカラムを洗浄した後、同緩衝液中、NaCl濃度を0.1、0.2、0.3、0.5 Mと上げてカラムに吸着したタンパク質を溶出させた。

(iii) 組換え型Meg-POTを含む0.1 M NaCl画分を、あらかじめ0.1% TFAを含む24%アセトニトリルで平衡化したVydac C4カラム (10 × 250 mm) に添加し、同溶離液にてカラムを洗浄した後、0.1% TFA中アセトニトリル濃度を48分間に24~48%まで直線的に上げてカラムに吸着したタンパク質を溶出させた。流速は1 ml/minで、タンパク質の検出は220 nm及び280 nmの二波長で行った。アセトニトリル濃度が40~45%の組換え型Meg-POTを含む画分を集め、次のGel Permeation Chromatographyにかけた。

(iv) 組換え型Meg-POTを含む画分を0.01% TFAを含む40%アセトニトリルで平衡化したTSK gel G3000 SWカラム (21.5 × 60 cm) に添加した。流速は3 ml/minでタンパク質の検出は280 nmで行った。37~44分に溶出された主要ピークを集め、0.1% TFAにて希釈後、(iii) と同条件にて逆相HPLCを行い主要ピークを回収した。

こうして得られた組換え型巨核球増幅因子 (Meg-POT) をSDS/PAGEにて分析した。ゲル濃度は12%で、Laemmliの方法Nature, 227, 680 (1970) に従って泳動し、2D-銀染色試薬・「第一」(第一化学薬品製) を用いてタンパク質を染色した。なお分子量マーカーはバイオラッド社製低分子量マーカー [ホスホリラーゼB (92.5 kd)、ウシ血清アルブミン (66.2 kd)、オボアルブミン (45.0 kd)、炭酸脱水素酵素 (31.0 kd)、大豆トリプシンインヒビター (21.5 kd)、リゾチーム (14.4 kd)] を用いた。

その結果、精製された組換え型Meg-POTは分子量約33,000に単一バンドを与えた。

実施例 25. 組換え型巨核球増幅因子 (Meg-POT) のN末端及びC末端アミノ酸配列分析

(i) 実施例 24 で得られた組換え型 Meg-POT について、気相式プロ
 テインシーケンサー 476A 型 (Applied Biosystems 社製
 5) を用いて N 末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、以下に示す (a) ~ (c) の 3 種類の N 末端アミノ酸配列が認められた。

(a) Ser-Arg-Thr-Leu-Ala-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-

(b) Leu-Ala-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-Asp-

(c) Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-Asp-Gly-Val-

10 これらの配列は実施例 13 における、配列 (a) ~ (c) に対応する。

(ii) 組換え型 Meg-POT の C 末端アミノ酸配列分析を行った。

組換え型 Meg-POT に 10 mg/ml の臭化シアンを含む 70% ギ酸溶液
 100 μ l を加え、室温にて 24 時間臭化シアン分解した後、遠心濃縮機にて過
 剰の試薬を除いた。その残渣を 0.1% TFA に溶解し、0.1% TFA 中で平
 15 衡化した Vydac C4 カラム (4.6 \times 250 mm) に添加し、0.1% TFA 中アセトニトリル濃度を 40 分間に 80% まで直線的に上げ、カラムに吸着
 した臭化シアン断片を溶出させた。得られた 2 本のピークのうち、C 末ペプチド
 断片について更に Endo Asp-N 消化した。C 末ペプチドを 50 mM リ
 ン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、Endo Asp-N を加え、室温に
 20 て 16 時間酵素消化した。反応液に 10% TFA を加え pH を 3 とした後、0.1% TFA で平衡化した Vydac C18 カラムに添加し、アセトニトリル濃
 度を 48 分間に 0 ~ 48% に直線的に上げカラムに吸着したペプチドを溶出させ
 た。得られた断片を気相式プロテインシーケンサー 476A 型にて分析した結
 果、C 末断片のアミノ酸配列は以下に示す如くであった。

Asp-Pro-Ser-Trp-Arg-Gln-Pro-Glu-Arg

25 実施例 26. CHO 細胞の培養上清中の巨核球増幅因子 (Meg-POT)活性の測定

実施例 23 で得られた CHO 細胞の培養上清及び、実施例 24 で精製した組換

え型巨核球増幅因子の巨核球増幅因子活性を前述した方法に従って測定した。

その結果表 6 に示したように、巨核球増幅因子の c D N A を含むベクターを導入した C H O 細胞の培養上清は明らかに巨核球増幅因子活性を示し、それより精製した組換え型巨核球増幅因子も巨核球増幅因子活性を示した。

- 5 なお、精製品の蛋白量はアミノ酸分析法により A 1 a = 2 8 として算出した。

[表 6]

CHO細胞の培養上清中及び精製組換え型Meg-POT
の巨核球増幅因子活性

被検々体終濃度		巨核球コロニー数
CHO細胞培養上清	0.08%	4 ^{a)}
	0.31%	11 ^{a)}
	1.25%	10.5 ^{a)}
	5%	12 ^{a)}
精製品	0.01 ng/ml	0 ^{b)}
	0.1 ng/ml	6 ^{b)}
	1 ng/ml	8 ^{b)}
	10 ng/ml	11 ^{b)}

a) 形成されたコロニー数からIL-3単独で形成されたコロニー数
(25個)を引いた値。

b) 形成されたコロニー数からIL-3単独で形成されたコロニー数
(20.5個)を引いた値。

実施例27. CHO細胞の培養上清からの組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)の精製II

実施例23で調製したCHO細胞の培養上清10l(10リットル)にTween 20を終濃度が0.01%になるように加え、5 μ mのメンブランフィルター(富士フィルム社製)を通して不溶物を除去した。この培養上清から以下の
5 手順により組換え型巨核球増幅因子を精製した。

(i) 上記培養上清を、スパイラルカートリッジ(アミコン社製)を用いて20倍に

濃縮した。濃縮液を4°Cにて攪拌しながら硫酸を最終的に50%飽和濃度になるように加え、析出した蛋白を遠心操作(10,000g x 30min)により沈澱として集め、10mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)に溶解した。その画分に、終濃度が1Mとなるように硫酸を加え、次の疎水クロマトグラフィーにかけた。

- 5 (ii) 1M 硫酸を含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で平衡化したPhenyl-sepharose 6FFカラム(5.0 x 15cm, Pharmacia 社製)に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄した後、硫酸濃度を0.1M まで下げてカラムを再び洗浄後、0.1% Tween 20を含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.5)で組換え型Meg-PO Tを溶出させた。この画分をメンブランフィルターPM-10 (アミコン社製)にて濃縮後、0.01% Tween 20を含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.5)で10倍希釈し、アニオン交換クロマトグラフィーにかけた。

- 10 (iii) 上記画分を希釈に用いた緩衝液にて平衡化したDEAE-sepharose fast flowカラム(5 x 13cm)に添加し、同緩衝液にてカラムを洗浄後、同緩衝液中NaCl濃度を0.1Mに上げてカラムに吸着した蛋白を溶出した。組換え型Meg-PO Tを含むこの画分を10% TFAを加えてpHを3とし、次に、下記に示す条件で逆相HPLCにかけた。

- (iv) 0.1% TFAを含む32%アセトニトリルで平衡化したVydac C4カラム(10 x 250mm)に上記画分を添加し、同溶離液にてカラムを洗浄後、0.1% TFA中アセトニトリル濃度を64分間に32~48%まで直線的に上げ、カラムに吸着した蛋白を溶出した。流速は1.0 ml/minで、蛋白の検出は220nm及び280nmの2波長で行った。40-45%のアセトニトリル濃度で溶出される画分を集め、0.1% TFAで2倍に希釈した。この溶液を同条件で逆相HPLCを行い、40-45%のアセトニトリル濃度に溶出する主要ピークを集め、次のGel Permeation Chromatographyにかけた。

- 20 (v) 0.1% TFA を含む40% アセトニトリルで平衡化したTSK G3000SWカラム(21.5 x 60cm)に上記画分を添加した。流速3 ml/minで蛋白の検出は280nmで行った。42-47分間に溶出された主要ピークを集め、0.1% TFAで希釈した。

- (vi) 上記画分を(iv)と同条件にて逆相HPLCを行い、主要画分を回収した。

- 必要に応じて、この画分をカチオン交換クロマトグラフィーにかけ、有機溶媒及びTFAを除いた。上記画分を0.01% Tween 20 を含む20mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)で10倍希釈し、同緩衝液にて平衡化したS-sepharose fast flowカラムに添加し

、同緩衝液でカラムを洗浄後、0.3M NaClを含む同緩衝液にて組換え型Meg-POTを溶出させた。

5 こうして得られた組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)をSDS/PAGEにて分析した。ゲル濃度は12%で、Laemmliの方法 Nature, 227, 680 (1970)に従って泳動し、2D-銀染色試薬・「第一」(第一化学薬品製)を用いてタンパク質を染色した。なお分子量マーカーは実施例15で使用したバイオラッド社製低分子量マーカーを用いた。

その結果、精製された組換え型Meg-POTは分子量約30,000に単一バンドを与えた。

10 このものの巨核球増幅因子活性を前述した方法に従って測定し、実施例24で得た分子量約33,000のものと比較した。その結果、表7に示したように、分子量約30,000のものは測定したいずれの濃度においても活性を示さなかった。

[表7]

精製された巨核球増幅因子の巨核球増幅因子活性

分子量	巨核球增幅因子活性 ^{a)}				
	終濃度(ng/ml)	40	10	2.5	0.625
約33、000		11	8.5	5	7
約30、000		1	0.5	0	1.5

a) 形成されたコロニー数からIL-3単独で形成されたコロニー数(25)を引いた値。

実施例28. 組換え型巨核球増幅因子(Meg-POT)のN末端及びC末端アミノ酸配列分析Ⅱ

15 ミノ酸配列分析Ⅱ

(i)実施例27で得られた分子量約30,000の組換え型Meg-POTに

ついて、気相式プロテインシーケンサー476A型（Applied Biosystems社製）を用いてN末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、以下に示す（a）～（c）の3種類のN末端アミノ酸配列が認められた。

（a）Ser-Arg-Thr-Leu-Ala-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-・・・

（b）Leu-Ala-Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-Asp-・・・

（c）Gly-Glu-Thr-Gly-Gln-Glu-Ala-Ala-Pro-Leu-Asp-Gly-Val-・・・

これらの配列は、実施例25における、配列（a）～（c）に対応する。

- 5 (ii)組換え型Meg-POTのC末端アミノ酸配列分析を行った。

分子量約33,000の組換え型Meg-POTに10mg/mlの臭化シア
ンを含む70%ギ酸溶液100 μ lを加え、室温にて24時間臭化シア
ン分解した後、遠心濃縮機にて過剰の試薬を除いた。その残渣を0.1%TFAに溶解し、0.1%TFAで平衡化したVydac C4カラム（4.6 x 250mm）に添加し、0.1%TFA中アセトニトリル濃度を40分間に80%まで直線的に上げ、カラムに吸着した臭化シア
ン断片を溶出させた。流速は1ml/min、ペプチドの検出は220nm及び280nmで行った。得られた2本のピークについて気相式プロテインシーケン
サー476A型にて分析した結果、C末断片のアミノ酸配列は以下に示す如くであ
った。

Asp-Ala-Leu-Arg-Gly-Leu-Leu-Pro-Val-Leu-Gly-Gln-Pro-Ile-Ile-Arg

- 15 実施例25から実施例28より、分子量約33,000と分子量約30,000のアミノ酸配列のN末端は同等であるが、C末端のみが相違する。一方、巨核球増幅因子活性については、分子量約33,000のものは活性を示すが、分子量約30,000のものは活性を示さない。したがって、分子量約33,000と約30,000の間のC末端のアミノ酸配列中に巨核球増幅因子活性に関与する重要な部位が存在することが考えられる。

20 実施例29. 組換え型巨核球増幅因子（Meg-POT）の精製Ⅲ

- (i)実施例24のBlue sepharose fast flow カラムから2M KClにより溶出されたMeg-POT画分をミニタン（millipore）にて脱塩後、4 $^{\circ}$ Cにて硫酸を50%飽和になるように加え30分攪拌し、生じた沈澱を遠心操作（10,000g x 25 30分間）により集め、蒸留水で溶解した。この溶液を4 $^{\circ}$ Cにて一晩、0.01% Twe

en 20 を含む10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、同緩衝液にて平衡化したQ-sepharose fast flow カラム (5 x 10cm, Pharmacia) に添加した。同緩衝液にてカラムを洗浄後、同緩衝液中NaCl濃度を0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0M と段階的に上げてカラムに吸着した蛋白質を溶出させた。各画分をSDS/PAGE 5 にかけた後、実施例23で作製したMeg-POTに対する抗体を用いてウェスタンブロッティング法でMeg-POTを検出した。この時の分子量マーカーは、バイオラッド社製プレステインド分子量マーカー〔ホスフォリラーゼB (106kd)、ウシ血清アルブミン (80.0kd)、オボアルブミン (49.5kd)、炭酸脱水素酵素 (32.5kd)、大豆トリプシンインヒビター (27.5kd)、リゾチーム (18.5kd)〕を用いた。その結果、分子量約70, 000にもバンドが染色された (図9)。この分子種にもMeg-POT活性が認められるか否か確認するため、分子量約33, 000の分子種と分離すべく以下に示す如く精製を行った。

(ii)分子量約70, 000の分子種が含まれる0.2M NaCl画分に酢酸を加えpHを5とした後、0.1% TFA を含む32% アセトニトリルで平衡化したVydac C4カラムに添加した。同溶離液にてカラムを洗浄後、0.1% TFA 中アセトニトリル濃度を32-48% まで40分間に直線的に上げ、カラムに吸着した蛋白を溶出させた。アセトニトリルの濃度が39-41%の画分を集め、次のゲル濾過にかけた。

(iii)上記画分を0.01% Tween 20 を含むPBSで希釈し、セントリプレッシャー 20 0で濃縮し、同緩衝液にて平衡化したTSK G3000SWカラムに添加した。流速は3ml/minで、蛋白の検出は220nm及び280nmの2波長で行った。1mlずつ分画し、一部をコロニー形成法によりMeg-POT活性を測定し、またSDS/PAGE後ウェスタンブロッティング法により、Meg-POTの検出を行った。その結果、分子量約70, 000の分子種は、42~46分に溶出され、その画分には分子量約33, 25 000の分子種は検出されなかった (図10)。なお、分子量マーカーは前述のバイオラッド社製分子量マーカーを用いた。

実施例26と同様に42~46分の画分のMeg-POT活性を測定したところ、表8に示すごとく、この42~46分の画分にもMeg-POT活性が認められたことから、分子量約70, 000の分子種にもMeg-POT活性がある 30 と推定された。

[表 8]

CHO細胞の培養上清の各精製画分の巨核球増幅因子活性

TSK G3000SW画分(分)	42-43	43-44	44-45	45-46
巨核球増幅因子活性 ^{a)}	12	9	10.5	5.5

a) : 形成されたコロニー数から、IL-3単独で形成されたコロニー数(19.5)を引いた値。

実施例30. 修飾体の発現ベクターの構築及びCOS細胞での発現

(1) pEFNKPOSベクターの構築

修飾体のMeg-POT遺伝子を得るためにPCRを用いた。PCRに用いるプライマーとして次に示すオリゴヌクレオチドを配列番号10に示した遺伝子の塩基配列をも
5 とに381A DNA Synthesizer(Applied Biosystems社製)を用いて合成した。

プライマー-3S : 5'-CTGGCTCACCGGCTCTCTGA-3'

プライマー-G982A : 5'-ATGGATCCTTACCGCCGGAACCGCGGCCG-3'

BamHI

組換えCHO細胞の培養上清から精製されたMeg-POTのC末端付近に存在する動物細胞内プロセシング酵素Furinの認識配列Arg-x-Arg-Arg²⁹⁵までをコードするMeg-POT遺伝子を作製し、これを用いてその発現ベクターを構築した。

pKP027を鋳型としてDNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus社製)を用いてPCR
10 を行なった。pKP027 1 μ gを20mM Tris-HCl(pH8.8), 10mM KCl, 6mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/ml BSA, 100mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP), プライマー-3S及びG982Aそれぞれ100pmolを含む100 μ lのPCR反応溶液中で増幅した。まず95℃で6分間変性後、85℃に冷却し2.5単位のパフ DNA Polymerase

(Stratagene社製)を加えた。その後、変性94℃ 1分間、アニール60℃ 30秒間、伸長72℃、2分間のサイクルを30回繰返してPCRを行なった(図11)。サンプルはアガロースゲル電気泳動し、増幅された590bpDNA断片を抽出した。Polynucleotide kinaseを用いてDNAの5'端をリン酸化し、予め制限酵素SmaIとアルカリフォスファターゼで処理したベクター-pSP73と連結し、pSP982Aを得た。この挿入塩基配列をDideoxy sequencing法にて決定し、982番目のGがTに置換されその3'側にBamHIサイトがあり、その他に変異がないことを確認した。

pSP982AとpRVHKP027を制限酵素SalI、BamHI処理した後、アガロースゲル電気泳動を行ないそれぞれより190bp、9.5kbpのDNA断片を回収し、これらを連結させpEFNKPOSを得た(図12)。

(2) COS細胞での発現

COS細胞を 1×10^7 個/mlになるようにPBSに懸濁し、この細胞浮遊液0.8mlにpEFNKPOSを20 μ g加えた。1500V、25 μ FDの条件でGenePulsar(BioRad社製)を用いて電気穿孔法(electroporation)によりプラスミドをCOS細胞に導入した。エレクトロポレーションした細胞を1%ウシ胎児血清を含むDMEM培地(GIBCO社製)に加え、72時間培養後培養上清を集めた。それぞれの培養上清をセントリプレッシャー10で約10倍に濃縮し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。実施例21で得られた大腸菌にて発現させ精製したMeg-POT蛋白質を抗原として家兎に免疫して得た抗巨核球増幅因子抗血清を用いて、ウェスタンブロッティングを行ない、培養上清中にMeg-POT修飾体の蓄積を確認した。

この培養上清の巨核球増幅因子活性を前述した方法に従って測定した。その結果を表9に示した。

[表9]

COS細胞の培養上清中の巨核球増幅因子活性

COS細胞	巨核球増幅因子活性 ^{a)}				
	10	5	2.5	1.25	0.625
培養上清濃度 (%)					

対照COS	1	0	0	1	1
pRVHKP027f導入COS	9.5	9.5	6.5	12	0
pEFNKPOS導入COS	9.5	0.5	1	0	0

a) 形成されたコロニー数からIL-3単独で形成されたコロニー数(40.5)を引いた値。

(3) アミノ酸置換Meg-POT発現ベクターの構築

PCRに用いるプライマーとして次に示すオリゴヌクレオチドを配列番号10に示した遺伝子の塩基配列をもとに381A DNA Synthesizer(Applied Biosystems社製)を用いて合成した。

プライマー-T3-2 : 5'-CATGATTACGCCAAGCTCGAA-3'

プライマー-754GA : 5'-GCTGCCTCCTCCTGGTCCTGGTCCAGGGGTCC-3'

プライマー-754GS : 5'-CCAGGACCAGGAGGAGGCAGCCAGGGCGGC-3'

プライマー-850GA : 5'-AGCACGGGCACCCAGGCCCCGAGAGCGTCC-3'

プライマー-850GS : 5'-CTGCGGGGCCTGGTGCCCGTGCTGGGCCAGCCC-3'

- 5 pEFNKPOSの252番目のLeuをValに置換したMeg-POT修飾体発現ベクター-pEFNKPOL 252Vを構築した。上記と同様の条件でpKP027をプライマー-T3-2と850GAの組み合わせと850GSとG982Aの組み合わせでそれぞれPCRを行なった。サンプルはゲル電気泳動を行い、それぞれ0.9kbp、150bpDNAを抽出した。これらDNA断片を混合後、
- 10 プライマー-T3-2とG982Aを用いて再度PCRを行なった(図11)。アガロースゲル電気泳動を行い、増幅された1kbpDNAを抽出した。Polynucleotide kinaseを用

いてDNAの5'端をリン酸化し、予め制限酵素SmaIとアルカリフォスファターゼで処理したベクターpSP73と連結しpSP850Gを得た。この挿入塩基配列をDideoxy sequencing法にて決定し、850番目のCがGに、982番目のGがTに置換されその3'側にBamHIサイトがあり、その他に変異がないことを確認した。pSP850GとpRVHKP027
5 を制限酵素SalI、BamHI処理した後、アガロースゲル電気泳動を行ないそれぞれより190bp、9.5kbpのDNA断片を回収し、これらを連結させpEFNKPOL252Vを得た（図12）。

またpEFNKPOSの220番目のGlnをGluに置換したMeg-POT修飾体発現ベクターpEFNKPOQ220Eを構築した。上記と同様の条件でpKP027をプライマーT3-2と754GAの組み合わせと754GSとG982Aの組み合わせでそれぞれPCRを行なった。サンプルはゲル電気泳動を行い、それぞれ0.9kbp、150bpDNAを抽出した。これらDNA断片を混合後、プライマーT3-2とG982Aを用いて再度PCRを行なった。アガロースゲル電気泳動を行い、増幅された1kbpDNAを抽出した。Polynucleotide kinaseを用いてDNAの5'端をリン酸化し、予め制限酵素SmaIとアルカリフォスファターゼで処理し
15 たベクターpSP73と連結しpSP754Gを得た。この挿入塩基配列をDideoxy sequencing法にて決定し、754番目のCがGに、982番目のGがTに置換されその3'側にBamHIサイトがあり、その他に変異がないことを確認した。pSP754GとpRVHKP027を制限酵素EcoRI、BamHI処理した後、アガロースゲル電気泳動を行ないそれぞれより1kbp、8.7kbpのDNA断片を回収し、これらを連結させpEFNKPOQ220Eを得た（図1
20 2）。

（4）アミノ酸置換Meg-POTのCOS細胞での発現

上記と同様にして電気穿孔法（electroporation）によりpEFNKPOL252V、pEFNKPOQ220EをCOS細胞に導入した。それぞれの72時間培養上清をセントリプレッ
-10で約10倍に濃縮し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。同様に
25 実施例21で得られた大腸菌にて発現させ精製したMeg-POT蛋白質を抗原として家兎に免疫して得た抗巨核球増幅因子抗血清を用いてウェスタンブロッティングを行ない、培養上清中にMeg-POT修飾体の蓄積を確認した。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Leu Ala Gly Glu Xaa Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu

1

5

10

15

配列番号 : 2

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu Ala

1

5

10

15

配列番号 : 3

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu Ala Asn

1

5

10

15

配列番号 : 4

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu Asp Gly Val Leu

1

5

10

配列番号 : 5

配列の長さ : 35

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu Ser Thr Glu

1

5

10

15

Gln Leu Arg Xaa Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro Glu Asp

20

25

30

Leu Asp Ala Leu Pro

35

配列番号 : 6

配列の長さ : 40

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : DNA

配列 :

CTCAACAGAG CAGCTGCGCT GTCTGGCTCA CCGGCTCTCT

40

配列番号 : 7

配列の長さ : 69

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA

配列 :

```

CGC CAA CTC CTT GGC TTC CCG TGT GCG GAG GTG TCC GGC CTG AGC      45
Arg Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser
    1              5              10              15
ACG GAG CGT GTC CGG GAG CTG GCT      69
Thr Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala
                20

```

配列番号 : 8

配列の長さ : 75

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA

配列 :

```

CTC TCT GAG CCC CCC GAG GAC CTG GAC GCC CTC CCA TTG GAC CTG      45
Leu Ser Glu Pro Pro Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu
    1              5              10              15
CTG CTA TTC CTC AAC CCA GAT GCG TTC TCG      75
Leu Leu Phe Leu Asn Pro Asp Ala Phe Ser
                20              25

```

配列番号 : 9

配列の長さ : 197

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

特徴：ヒト膀胱癌患者のリンパ節から得られた培養細胞に由来し、ヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドの一部をコードするcDNA。

配列：

AA CTC CTT GGC TTC CCG TGT GCG GAG GTG TCC GGC CTG AGC ACG 44

Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr

1 5 10

GAG CGT GTC CGG GAG CTG GCT GTG GCC TTG GCA CAG AAG AAT GTC 89

Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val

15 20 25

AAG CTC TCA ACA GAG CAG CTG CGC TGT CTG GCT CAC CGG CTC TCT 134

Lys Leu Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser

30 35 40

GAG CCC CCC GAG GAC CTG GAC GCC CTC CCA TTG GAC CTG CTG CTA 179

Glu Pro Pro Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu

45 50 55

TTC CTC AAC CCA GAT GCG 197

Phe Leu Asn Pro Asp Ala

60 65

配列番号：10

配列の長さ：2129

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

直接の起源：プラスミド pKPO27

特徴：ヒト膀胱癌患者のリンパ節から得られた培養細胞に由来し、ヒト巨核球増幅因子活性を有するポリペプチドをコードするcDNA。

配列：

GAATTCGGCA CGAGGCCACT CCCGTCTGCT GTGACGCGCG GACAGAGAGC	50
TACCGGTGGA CCCACGGTGC CTCCTCCCT GGGATCTACA CAGACC ATG GCC	102
	Met Ala
	1
TTG CCA ACG GCT CGA CCC CTG TTG GGG TCC TGT GGG ACC CCC GCC	147
Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro Ala	
5 10 15	
CTC GGC AGC CTC CTG TTC CTG CTC TTC AGC CTC GGA TGG GTG CAG	192
Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln	
20 25 30	
CCC TCG AGG ACC CTG GCT GGA GAG ACA GGG CAG GAG GCT GCA CCC	237
Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro	
35 40 45	
CTG GAC GGA GTC CTG GCC AAC CCA CCT AAC ATT TCC AGC CTC TCC	282
Leu Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser	
50 55 60	
CCT CGC CAA CTC CTT GGC TTC CCG TGT GCG GAG GTG TCC GGC CTG	327
Pro Arg Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu	
65 70 75	
AGC ACG GAG CGT GTC CGG GAG CTG GCT GTG GCC TTG GCA CAG AAG	372
Ser Thr Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys	

80	85	90	
AAT GTC AAG CTC TCA ACA GAG CAG CTG CGC TGT CTG GCT CAC CGG			417
Asn Val Lys Leu Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg			
95	100	105	
CTC TCT GAG CCC CCC GAG GAC CTG GAC GCC CTC CCA TTG GAC CTG			462
Leu Ser Glu Pro Pro Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu			
110	115	120	
CTG CTA TTC CTC AAC CCA GAT GCG TTC TCG GGG CCC CAG GCC TGC			507
Leu Leu Phe Leu Asn Pro Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys			
125	130	135	
ACC CGT TTC TTC TCC CGC ATC ACG AAG GCC AAT GTG GAC CTG CTC			552
Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu			
140	145	150	
CCG AGG GGG GCT CCC GAG CGA CAG CGG CTG CTG CCT GCG GCT CTG			597
Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu			
155	160	165	
GCC TGC TGG GGT GTG CGG GGG TCT CTG CTG AGC GAG GCT GAT GTG			642
Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val			
170	175	180	
CGG GCT CTG GGA GGC CTG GCT TGC GAC CTG CCT GGG CGC TTT GTG			687
Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu Pro Gly Arg Phe Val			
185	190	195	
GCC GAG TCG GCC GAA GTG CTG CTA CCC CGG CTG GTG AGC TGC CCG			732
Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu Val Ser Cys Pro			
200	205	210	
GGA CCC CTG GAC CAG GAC CAG CAG GAG GCA GCC AGG GCG GCT CTG			777
Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg Ala Ala Leu			
215	220	225	

CAG GGC GGG GGA CCC CCC TAC GGC CCC CCG TCG ACA TGG TCT GTC	822
Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp Ser Val	
230 235 240	
TCC ACG ATG GAC GCT CTG CGG GGC CTG CTG CCC GTG CTG GGC CAG	867
Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln	
245 250 255	
CCC ATC ATC CGC AGC ATC CCG CAG GGC ATC GTG GCC GCG TGG CGG	912
Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg	
260 265 270	
CAA CGC TCC TCT CGG GAC CCA TCC TGG CGG CAG CCT GAA CGG ACC	957
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr	
275 280 285	
ATC CTC CGG CCG CGG TTC CGG CGG GAA GTG GAG AAG ACA GCC TGT	1002
Ile Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys	
290 295 300	
CCT TCA GGC AAG AAG GCC CGC GAG ATA GAC GAG AGC CTC ATC TTC	1047
Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe	
305 310 315	
TAC AAG AAG TGG GAG CTG GAA GCC TGC GTG GAT GCG GCC CTG CTG	1092
Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu	
320 325 330	
GCC ACC CAG ATG GAC CGC GTG AAC GCC ATC CCC TTC ACC TAC GAG	1137
Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu	
335 340 345	
CAG CTG GAC GTC CTA AAG CAT AAA CTG GAT GAG CTC TAC CCA CAA	1182
Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln	
350 355 360	
GGT TAC CCC GAG TCT GTG ATC CAG CAC CTG GGC TAC CTC TTC CTC	1227

Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu	
365 370 375	
AAG ATG AGC CCT GAG GAC ATT CGC AAG TGG AAT GTG ACG TCC CTG	1272
Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu	
380 385 390	
GAG ACC CTG AAG GCT TTG CTT GAA GTC AAC AAA GGG CAC GAA ATG	1317
Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met	
395 400 405	
AGT CCT CAG GTG GCC ACC CTG ATC GAC CGC TTT GTG AAG GGA AGG	1362
Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg	
410 415 420	
GGC CAG CTA GAC AAA GAC ACC CTA GAC ACC CTG ACC GCC TTC TAC	1407
Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr	
425 430 435	
CCT GGG TAC CTG TGC TCC CTC AGC CCC GAG GAG CTG AGC TCC GTG	1452
Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val	
440 445 450	
CCC CCC AGC AGC ATC TGG GCG GTC AGG CCC CAG GAC CTG GAC ACG	1497
Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr	
455 460 465	
TGT GAC CCA AGG CAG CTG GAC GTC CTC TAT CCC AAG GCC CGC CTT	1542
Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu	
470 475 480	
GCT TTC CAG AAC ATG AAC GGG TCC GAA TAC TTC GTG AAG ATC CAG	1587
Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln	
485 490 495	
TCC TTC CTG GGT GGG GCC CCC ACG GAG GAT TTG AAG GCG CTC AGT	1632
Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser	

500	505	510	
CAG CAG AAT GTG AGC ATG GAC TTG GCC ACG TTC ATG AAG CTG CGG			1677
Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg			
515	520	525	
ACG GAT GCG GTG CTG CCG TTG ACT GTG GCT GAG GTG CAG AAA CTT			1722
Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu			
530	535	540	
CTG GGA CCC CAC GTG GAG GGC CTG AAG GCG GAG GAG CGG CAC CGC			1767
Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg			
545	550	555	
CCG GTG CGG GAC TGG ATC CTA CGG CAG CGG CAG GAC GAC CTG GAC			1812
Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp			
560	565	570	
ACG CTG GGG CTG GGG CTA CAG GGC GGC ATC CCC AAC GGC TAC CTG			1857
Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu			
575	580	585	
GTC CTA GAC CTC AGC GTG CAA GAG GCC CTC TCG GGG ACG CCC TGC			1902
Val Leu Asp Leu Ser Val Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys			
590	595	600	
CTC CTA GGA CCT GGA CCT GTT CTC ACC GTC CTG GCA CTG CTC CTA			1947
Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu			
605	610	615	
GCC TCC ACC CTG GCC TGA			1965
Ala Ser Thr Leu Ala			
620			
GGGCCCCACT CCCTTGCTGG CCCAGCCCT GCTGGGGATC CCCGCCTGGC			2015
CAGGAGCAGG CACGGGTGAT CCCCGTTCCA CCCCAAGAGA ACTCGCGCTC			2065
AGTAAACGGG AACATGCCCC CTGCAGACAC GTAAAAA AAAA			2115

AAAAAACT CGAG

2129

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu

1

5

10

15

Asp Gly

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 5 8 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro

1

5

Leu Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser

10

15

20

Pro Arg Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu

25

30

35

Ser Thr Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys

40

45

50

Asn Val Lys Leu Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg

55

60

65

Leu Ser Glu Pro Pro Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu

70

75

80

Leu Leu Phe Leu Asn Pro Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys		
85	90	95
Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu		
100	105	110
Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu		
115	120	125
Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val		
130	135	140
Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu Pro Gly Arg Phe Val		
145	150	155
Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu Val Ser Cys Pro		
160	165	170
Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg Ala Ala Leu		
175	180	185
Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp Ser Val		
190	195	200
Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln		
205	210	215
Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg		
220	225	230
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr		
235	240	245
Ile Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys		
250	255	260
Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe		
265	270	275
Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu		
280	285	290
Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu		
295	300	305

Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln		
310	315	320
Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu		
325	330	335
Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu		
340	345	350
Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met		
355	360	365
Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg		
370	375	380
Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr		
385	390	395
Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val		
400	405	410
Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr		
415	420	425
Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu		
430	435	440
Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln		
445	450	455
Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser		
460	465	470
Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg		
475	480	485
Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu		
490	495	500
Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg		
505	510	515
Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp		
520	525	530

- 60 -

100	105	110
Pro Arg Gly Ala	Pro Glu Arg Gln Arg Leu	Leu Pro Ala Ala Leu
115	120	125
Ala Cys Trp Gly Val	Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val	
130	135	140
Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu	Pro Gly Arg Phe Val	
145	150	155
Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu Val Ser Cys Pro		
160	165	170
Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg Ala Ala Leu		
175	180	185
Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp Ser Val		
190	195	200
Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln		
205	210	215
Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg		
220	225	230
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg		
235	240	245
		248

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 1 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれを一部置換、欠除もしくは付加した塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含む DNA。
- 5 2. 請求項 1 記載の DNA を含有する組換えベクター。
3. 請求項 2 記載の組換えベクターにより形質転換された原核または真核宿主細胞。
4. 請求項 3 記載の宿主細胞を培養し、産生されたタンパク質を分離することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。
- 10 5. 請求項 4 記載の組換えタンパク質が巨核球増幅因子活性を有するタンパク質である組換えタンパク質の製造方法。
6. 配列番号 1 3 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれを一部置換、欠除もしくは付加した塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含む DNA。
- 15 7. 請求項 6 記載の DNA を含有する組換えベクター。
8. 請求項 7 記載の組換えベクターにより形質転換された原核または真核宿主細胞。
9. 請求項 8 記載の宿主細胞を培養し、産生されたタンパク質を分離することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。
- 20 10. 請求項 9 記載の組換えタンパク質が巨核球増幅因子活性を有するタンパク質である組換えタンパク質の製造方法。

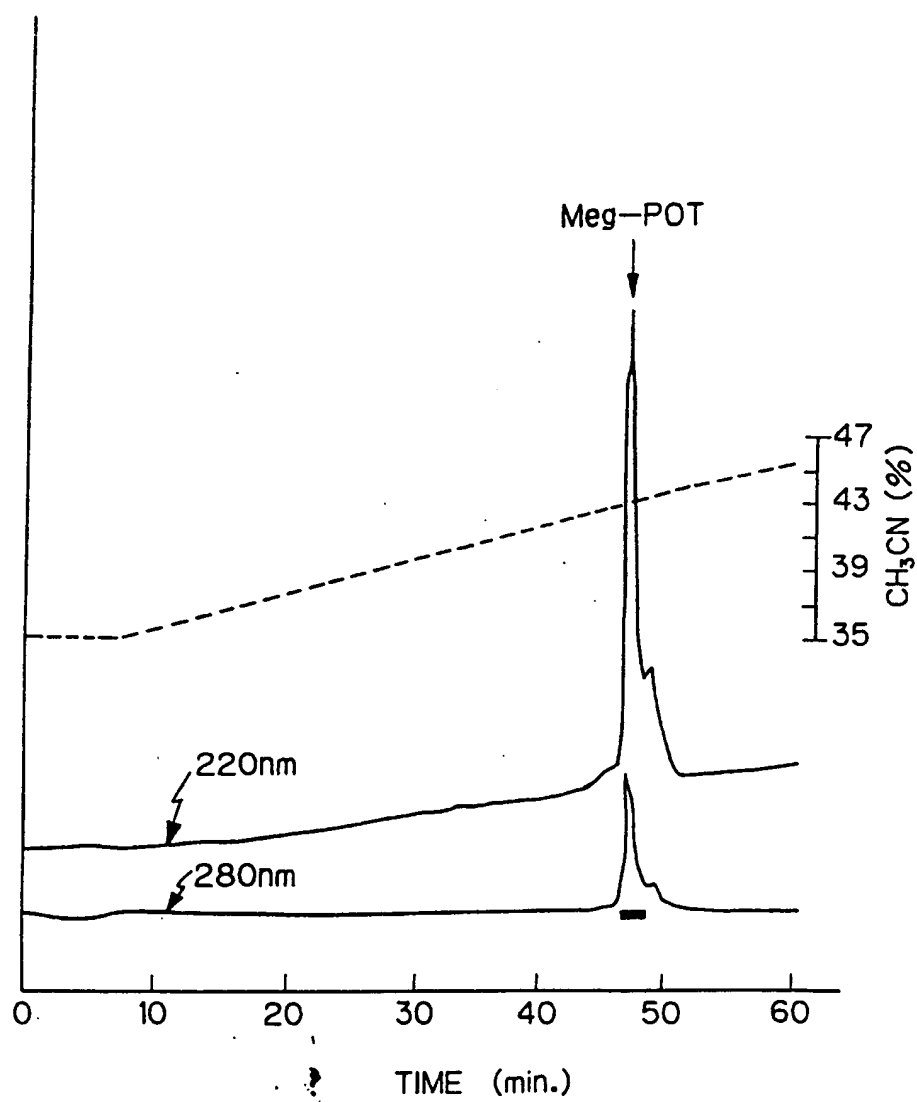
Fig. 1

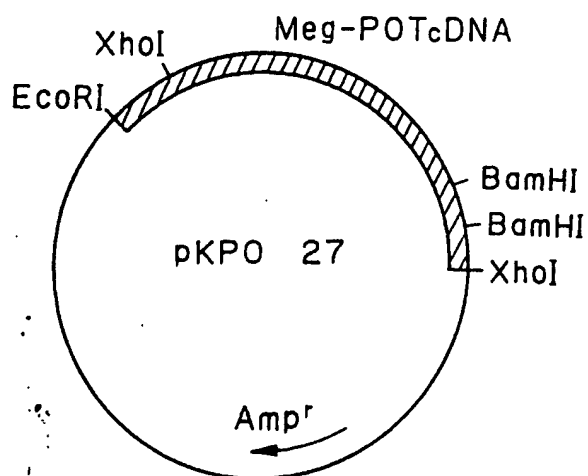
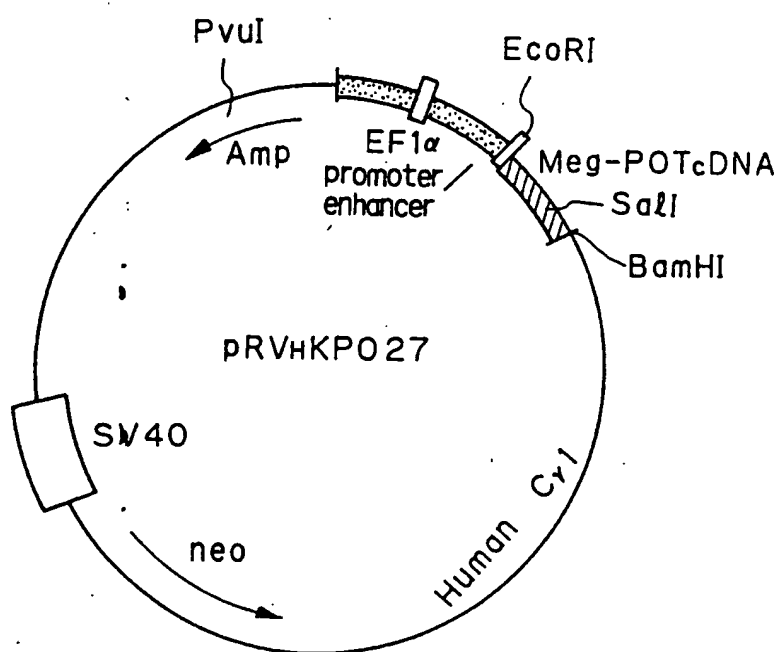
Fig. 2*Fig. 3*

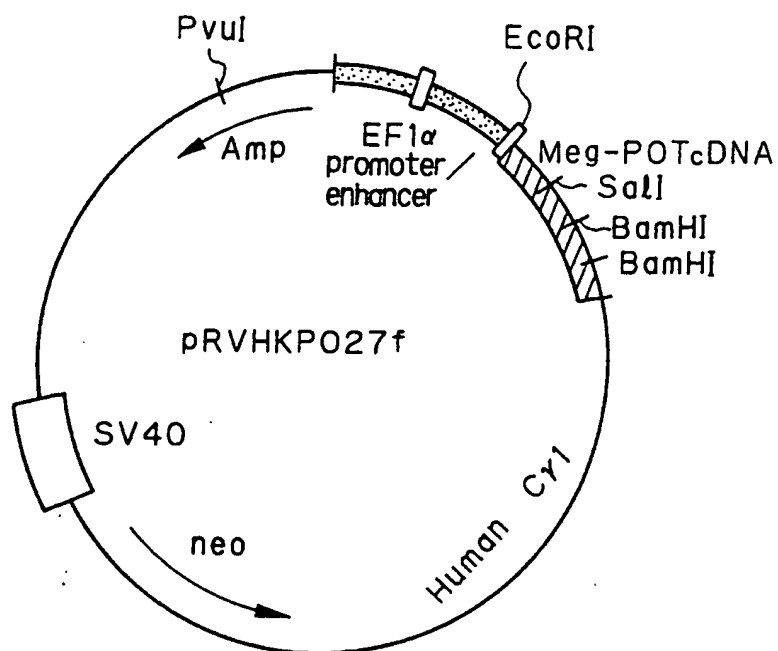
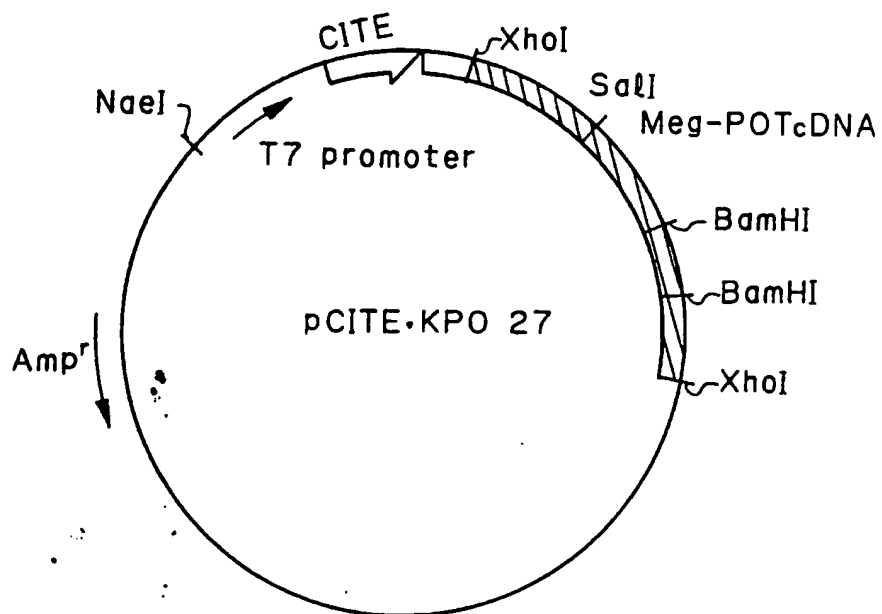
Fig. 4*Fig. 5*

Fig. 6

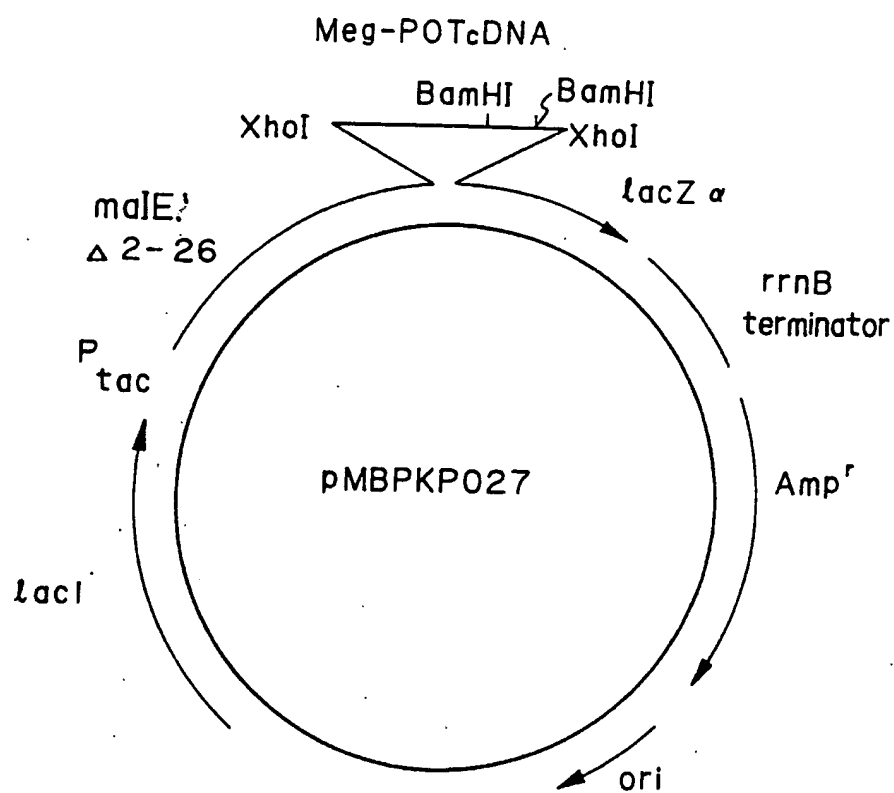


Fig. 7

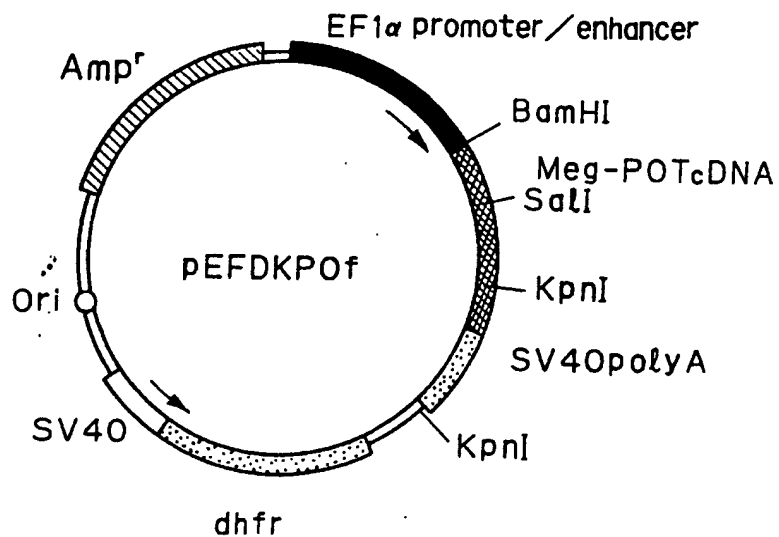


Fig. 8

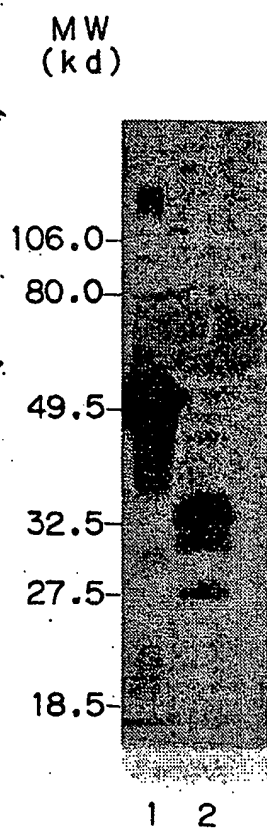


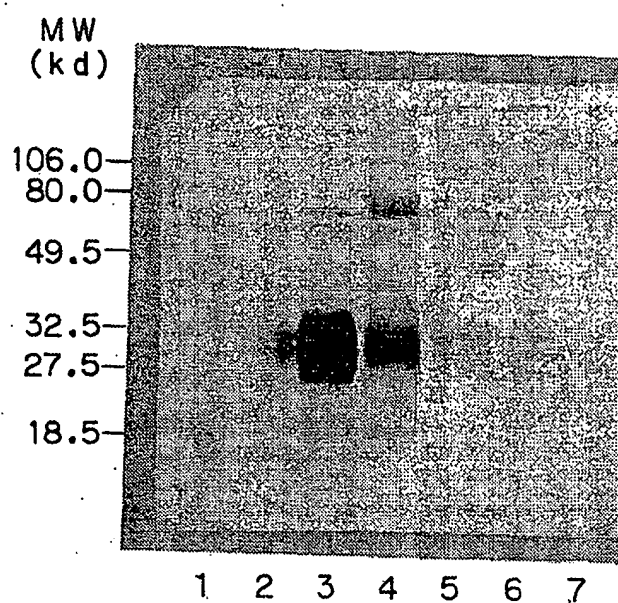
Fig. 9

Fig. 10

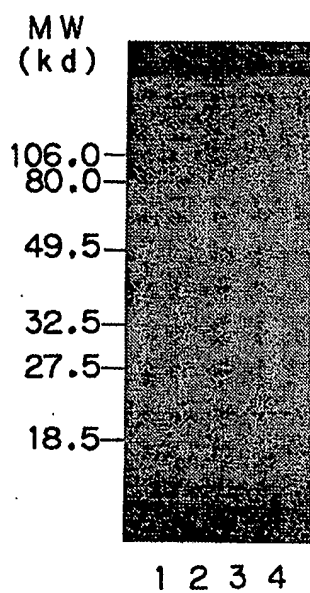
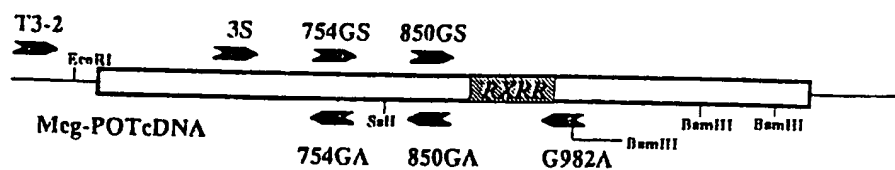
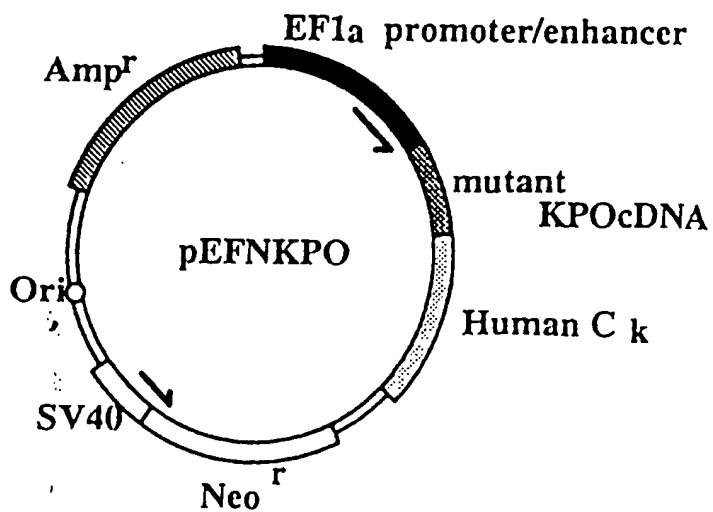


Fig. 11*Fig. 12*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁵ C12N15/19, C12P21/02, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁵ C12N15/19, C12P21/02, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L
BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 4-295500 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), October 20, 1992 (20. 10. 92), & WO, A, 92/17500 & AU, A, 9214350	1-10
P, A	WO, A1, 93/16106 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), August 19, 1993 (19. 08. 93), (Family: none)	1-10
P, A	WO, A1, 93/13132 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) July 8, 1993 (08. 07. 93), & ZA, A, 9209991	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 5, 1994 (05. 01. 94)

Date of mailing of the international search report

January 25, 1994 (25. 01. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ³ C12N15/19, C12P21/02, C12N5/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ³ C12N15/19, C12P21/02, C12N5/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE, WPI, WPI/L BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 4-295500 (旭化成工業株式会社), 20. 10月. 1992 (20. 10. 92), &WO, A, 92/17500 & AU, A, 9214350	1-10
P, A	WO, A1, 93/16106 (旭化成工業株式会社), 19. 8月. 1993 (19. 08. 93) (ファミリーなし)	1-10
P, A	WO, A1, 93/13132 (中外製薬株式会社), 8. 7月. 1993 (08. 07. 93), &ZA, A, 9209991	1-10
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
05. 01. 94		25. 01. 94
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 佐伯裕子 ⑥ 電話番号 03-3581-1101 内線 3449